



HAL
open science

Apport de la neuro-endocrinologie de l'appareil génital à l'étude des régulations hormonales de la fonction de barrière intestinale : des interactions viscéro-viscérales aux perturbations endocriniennes

Eric Houdeau

► To cite this version:

Eric Houdeau. Apport de la neuro-endocrinologie de l'appareil génital à l'étude des régulations hormonales de la fonction de barrière intestinale : des interactions viscéro-viscérales aux perturbations endocriniennes. Toxicologie et chaîne alimentaire. Institut National Polytechnique (Toulouse), 2017. tel-02806946

HAL Id: tel-02806946

<https://hal.inrae.fr/tel-02806946>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**Mémoire pour l'obtention du diplôme
d'Habilitation à Diriger des Recherches**

sur le thème

**Apport de la neuro-endocrinologie de l'appareil génital
à l'étude des régulations hormonales de la fonction
de barrière intestinale :**
des interactions viscéro-viscérales aux perturbations
endocriniennes

par **Eric HOUDEAU**
Chargé de Recherche INRA

Institut National Polytechnique de Toulouse

Membres du jury proposés,

Dr Pascale PLAISANCIE, Directeur de Recherche INRA, UMR1235, INSA Lyon
Dr Bernard JEGOU, Directeur de Recherche INSERM, U625, Univ. Rennes
Dr Jean-Pierre SEGAIN, Chargé de Recherche INRA, UMR1280 - Nantes
Pr Stanislas BRULEY DES VARANNES, CHU Hotel Dieu Nantes
Dr Philippe CHEMINEAU, Directeur de Recherche INRA, DEPE, Paris
Pr Hervé REMIGNON, ENSA Toulouse

Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

Equipe de Neuro-Gastroentérologie & Nutrition
UMR 1331, Toxalim
Centre INRA Toulouse Midi-Pyrénées
180, chemin de Tournefeuille BP 93173
31027 Toulouse cedex 3

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| CURRICULUM VITAE | 5 |
| • <i>Etat civil</i> | 5 |
| • <i>Activité professionnelle</i> | 5 |
| • <i>Formation & Diplômes universitaires</i> | 5 |
| • <i>Activité d'enseignement</i> | 6 |
| • <i>Animation scientifique – Projets, Contrats</i> | 6 |
| • <i>Activité d'encadrement – Thèses, M2R, Diplôme Ingénieur</i> | 7 |
| • <i>Expertise scientifique - Jury de concours – Sociétés scientifiques</i> | 8 |
| PRODUCTION SCIENTIFIQUE | 9 |
| • <i>Articles de recherche dans des revues à comité de lecture</i> | 9 |
| • <i>Article de revue</i> | 11 |
| • <i>Chapitres d'ouvrage</i> | 11 |
| • <i>Presse professionnelle (santé et alimentation)</i> | 11 |
| • <i>Conférences (invité)</i> | 11 |
| • <i>Communications orales dans congrès</i> | 12 |
| • <i>Contribution à l'interaction Sciences-Société (médias)</i> | 12 |
| | |
| 1- INTRODUCTION GENERALE | 14 |
| | |
| 2- EXPOSE DES RECHERCHES I – <i>PÉRIODE “TRACTUS GÉNITAL”</i> | 17 |
| | |
| INNERVATION AUTONOME et FONCTION DE REPRODUCTION : origines, distribution et rôles de l'innervation dans le myomètre | 17 |
| | |
| 2.1. Activité utérine et innervation: introduction aux travaux de recherche | 17 |
| 2.1.a. Origine de l'innervation autonome et sensitive de l'utérus : un débat | 17 |
| 2.1.b. Concept de l'innervation noradrénergique à “axone court” des ganglions pelviens | 21 |
| | |
| 2.2. Contribution à l'étude de l'innervation adrénérergique et peptidergique du tractus génital chez la rate | 21 |
| 2.2.a. Innervation noradrénergique des ovaires, de l'utérus et du cervix : une hétérogénéité dans l'origine et la distribution des terminaisons nerveuses | 21 |
| 2.2.b. Contribution du plexus pelvien dans l'innervation sympathique, parasymphatique et peptidergique du myomètre | 24 |
| 2.2.c. Les cellules SIF : une “glande endocrine” dans les ganglions nerveux pelviens | 24 |
| | |
| 2.3. Intégration du signal nerveux autonome et motricité utérine | 26 |
| 2.3.a. Rôle fonctionnel de l'innervation cholinergique au cours du cycle sexuel chez la rate : influence du statut stéroïdien et voies réflexes de libération d'acétylcholine | 27 |
| 2.3.b. Innervation autonome et insémination artificielle dans les élevages : importance du geste d'insémination dans les résultats de fertilité | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4. Régulation du système phospholipase C (PLC) myométrial au cours de la gestation: un support à la transduction du signal nerveux autonome et ocytocinergique | 30 |
| 2.4. Conclusions sur les travaux de la période « tractus génital » | 32 |
| 3- EXPOSE DES RECHERCHES II – PÉRIODE “TRACTUS DIGESTIF” | 33 |
| CYTOKINES et HORMONES SEXUELLES : un support aux interactions viscéro-viscérales entre appareil génital et barrière intestinale | 33 |
| 3.1. Statut hormonal et tractus gastrointestinal : introduction aux travaux de recherche | 33 |
| 3.1.a. Maladies inflammatoires chroniques de l’intestin (MICI) et troubles de la fertilité : données cliniques | 34 |
| 3.1.b. syndrome de l’intestin irritable (SII) et MICI: prévalence liée au sexe et influence du statut hormonal | 35 |
| 3.2. Influence d’une inflammation dans le côlon sur la fonction de reproduction : vers des troubles de la fertilité | 35 |
| 3.2.a. L’utérus, un organe en continuelle activité inflammatoire: rôle des oestrogènes | 35 |
| 3.2.b. Influence d’une colite sur le cycle sexuel et la contractilité myométriale | 36 |
| 3.3. Contrôle hormonal de la réponse inflammatoire dans le côlon : la balance oestro-progestative comme <i>chef d’orchestre</i> | 37 |
| 3.3.a. Influence du statut hormonal sur la réponse inflammatoire dans le côlon | 37 |
| 3.3.b. Le <i>macrophage migration inhibitory factor</i> (MIF): une cytokine cible des stéroïdes sexuels et un facteur de prédisposition aux MICI | 37 |
| 3.4. Oestradiol et perméabilité paracellulaire épithéliale dans le côlon : une régulation fine de la fonction de barrière intestinale | 40 |
| 3.5. Bisphénol A et barrière intestinale : un nouveau concept de perturbation endocrinienne | 42 |
| 3.5.a. Le BPA des plastiques alimentaires : effets d’une contamination orale chez l’adulte sur la fonction de barrière intestinale et la sensibilité viscérale | 43 |
| 3.5.b. Période périnatale et BPA: conséquences d’une exposition <i>in utero</i> et pendant la lactation sur la fonction de barrière intestinale à l’âge adulte | 45 |
| 4- PROJETS EN COURS & PERSPECTIVES | 46 |
| 4.1. Priorités thématiques et projets structurants | 46 |
| 4.2. Etude du potentiel inhibiteur du diarylpropionitrile, un agoniste sélectif des ERβ, sur l’hyperperméabilité intestinale induite par un stress chez le rat : implications dans le SII | 47 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3. Isoflavones du germe de soja et SII : vers une nouvelle allégation fonctionnelle? | 49 |
| 4.4. Effets précoces du BPA sur le développement de la barrière intestinale et la programmation métabolique du foie et du tissu adipeux : conséquences à long terme pour l'adulte | 51 |
| 4.4.a. Données préalables sur la maturation périnatale de l'axe intestin-foie | 51 |
| 4.4.b. Les apports de <i>PérinaTox</i> : un projet ANR structurant pour Toxalim | 52 |
| 4.4.c. Période périnatale : plus loin dans la définition d'hypersensibilité à l'oestradiol et aux xénoestrogènes | 54 |
| | |
| 5- CONCLUSION GENERALE | 58 |
| | |
| 6- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 60 |

Etat civil*Eric Houdeau*Né le 5 novembre 1966 à Paris 9^{ème}

Nationalité : Française

Marié, 2 enfants

4, impasse Larrieu 31600 Lherm

Adresse professionnelle : INRA, Unité de Neuro-Gastroentérologie & Nutrition
 180, chemin de Tournefeuille BP 93073
 31027 Toulouse cedex 3

Téléphone: 05 61 28 55 57

E-mail: eric.houdeau@toulouse.inra.fr**Activité professionnelle**

| | |
|----------------|---|
| Janvier 2010 | <i>Toxalim</i> , INRA Toulouse <i>Equipe4 - Neuro-Gastroentérologie & Nutrition</i> (V Théodorou) Département ALIMENTATION HUMAINE (ALIMH) UMR 1331 – Directeur B Salles |
| 2003-2010 | <i>Unité de Neuro-Gastroentérologie & Nutrition</i> , Toulouse Département ALIMENTATION HUMAINE (ALIMH) INRA/EI Purpan UMR 1054 – Directeur J Fioramonti, puis V Théodorou |
| 1997-2002 | <i>Laboratoire de Neurobiologie des Fonctions Végétatives</i> , Jouy-en-Josas, Département PHYSIOLOGIE ANIMALE (PHASE) INRA UR 1060 – Directeur J-P Rousseau, puis O Rampin |
| Septembre 2001 | Chargé de Recherche 1 ^{ère} classe INRA |
| Septembre 1997 | Recrutement Chargé de Recherche 2 ^{ème} classe INRA |
| 1996-97 | <i>Laboratoire de Physiologie et Thérapeutique</i> ENV Toulouse – Directeur P-L Toutain |
| 1986-96 | Imprimeur rotativiste de la Presse Parisienne (temps partiel) |

Formation & Diplômes Universitaires

| | |
|--------------|--|
| 1998 | <i>Expérimentation Animale Niveau I</i> , ENV Toulouse. |
| 1997 | <i>Diplôme Universitaire de Pharmacocinétique</i> Université Paul Sabatier, Toulouse |
| Janvier 1996 | <i>Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)</i> , Physiologie de la Reproduction (mention <i>Très Honorable et Félicitations du Jury</i>) |
| 1993 | <i>(service militaire)</i> |
| 1990 | <i>Diplôme d'Etudes Approfondies</i> , Physiologie de la Reproduction (Paris VI) Boursier MRT (mention <i>Bien</i>) |
| 1989 | <i>Maîtrise de Physiologie Animale</i> (Paris VI) |

- 1988 *Licence de Biologie Cellulaire et Physiologie (Paris VI)*
- 1987 *DEUG en Sciences de la Vie (Paris VI)*

Activités d'enseignement

Cours,

- 2008-10 Intervenant dans l'enseignement EI Purpan (Toulouse)
ENDOCRINOLOGIE DE L'APPAREIL DIGESTIF ET PERTURBATEURS ENDOCRINIENS
- 2007-10 Intervenant dans l'enseignement M2R EQSA (ENSA, Toulouse)
SÉCURITÉ ALIMENTAIRE ET PERTURBATEURS ENDOCRINIENS
- 2001 Intervenant dans l'enseignement de *Physiologie de la Reproduction* (ENSA, Rennes), NEUROPHYSIOLOGIE DE L'APPAREIL GÉNITAL & ZOOTECHNIE

Animation scientifique (projets & contrats)

2011-14 : ANR CONTAMINANTS, ECOSYSTÈMES, SANTÉ (CES 2010), *coordinateur* [E. Houdeau](#)
« **PERINATOX** : Effets précoces du Bisphénol A sur le développement de la barrière intestinale et la programmation métabolique du foie et du tissu adipeux : conséquences à long terme pour l'adulte ».

2010-11 ACTION INCITATIVE CONCERTÉE CEPIA - ACTION PRIORITAIRE ALIMH
« **LUCKY LOCK ET LES 1000 DALTONS** : Programme Nanomatériaux, Contaminants Alimentaires », *responsables* [E. Houdeau](#) et [S. Peyron](#) (UMR IATE, INRA/CIRAD, Montpellier).

2009-12 : ANR BLANC,
« **FLORADIP** : Rôle de la flore intestinale sur le développement du tissu adipeux », *responsables du WP "Gastroentérologie"* [E. Houdeau](#) et [V. Théodorou](#) - *coordinateur* R. Burcelin, INSERM U 858.

2009-11 : ACTION PRIORITAIRE ALIMH, *coordinateur* [E. Houdeau](#).
« Effets d'une exposition chronique de la femelle gestante et allaitante aux faibles doses de Bisphénol A et conséquences immunitaires sur la descendance à l'âge adulte ».

2007-10 : ANR-PROGRAMME NATIONAL DE RECHERCHE EN ALIMENTATION ET NUTRITION HUMAINE (PNRA 2006),
« **PLAST-IMPACT** : impacts métabolique et endocrinien de deux contaminants de la chaîne alimentaire issus de la plasturgie : le Bisphénol A et le DEHP (diéthylhexylphtalate) », *responsable du WP "Gastroentérologie"* [E. Houdeau](#) - *coordinateur* T. Pineau, INRA UR 66.

2006-08 : APPEL À PROJETS RECHERCHE ET TRANSFERT DE TECHNOLOGIES (APRT) - REGION MIDI-PYRENEES - SECTEUR AGRO-BIO-SANTE
« Etude génétique et physiologique des teneurs et compositions en isoflavones et autres métabolites secondaires à activité antioxydante du soja et évaluation des effets de ces composés vis-à-vis d'une inflammation digestive expérimentale », *porteurs du projet* M. Verget et J. Daydé, INRA-EI Purpan UMR 1054.

1999-2001 : ETUDES POUR LE COMPTE DE SANOFI-SYNTHELABO,
« Evaluation des effets de molécules antagonistes de l'ocytocine dans l'optique du traitement de la menace d'accouchement prématuré. Expertises *in vivo* chez la rate équipées en télémétrie de 6 molécules en phase de développement », *responsables* [E. Houdeau](#) et [G. Germain](#), INRA UMR 1198.

Activité d'encadrement

Doctorats,

- Nov 2010 Nabila MOUSSAOUI, **1^{ère} année de thèse** (ED SEVAB Pathologie, Toxicologie, Génétique & Nutrition, Université Paul Sabatier, Toulouse)
Financement INRA/Région Midi-Pyrénées – Responsable projet – Co-direction P Martin
Projet: Influence des oestrogènes endogènes et d'origine alimentaire sur la maturation périnatale de l'axe intestin-foie: conséquences pour l'adulte
- 2008/... Lara MOUSSA, **3^{ème} année de thèse** (Université Paul Sabatier, Toulouse)
Contrat CIFRE (société Génibio Industrie) – Co-directeur - Direction V Théodorou
Projet: Effets d'un ingrédient à base de germe de soja (*Glycine max* (L.) merr.) fermenté sur l'intégrité de la barrière intestinale et la sensibilité viscérale : mécanismes d'action impliqués
- 2007/10 Viorica BRANISTE, **Thèse soutenue le 13 janvier 2011** (ED SEVAB Pathologie, Toxicologie, Génétique & Nutrition, Université Paul Sabatier, Toulouse) *Allocataire MRT – Responsable projet – Co-Direction J Fioramonti*
Projet: **II.** Effets d'exposition chronique aux faibles doses de BPA et de DEHP - contaminants de la chaîne alimentaire- sur la fonction de barrière intestinale chez la rate

Responsable de DEA/M2R/M2Pro & Diplôme Ingénieur,

- 2011 Laure DUCASSE, **M2Pro** (UPS, Toulouse)
Spécialité Méthodes Biologiques & Evaluation des Risques pour l'Homme
Projet: Evaluation de l'impact biologique de deux classes de nanoparticules issus de matériaux à usage alimentaire ou cosmétique sur la fonction de barrière intestinale chez le rat
- 2009 Aurore JOUAULT, **Diplôme d'Ingénieur ISTAB/M2R** (Bordeaux 1)
Option Nutrition
Projet: Effets d'une exposition chronique de la femelle gestante et allaitante aux faibles doses de Bisphénol A et conséquences immunitaires sur la descendance à l'âge adulte
- 2007/08 Mathilde LEVEQUE, **Diplôme d'Ingénieur CNAM** (Toulouse)
Spécialité Sciences & Techniques du Vivant, Option Génie Biologique
Projet: Effets d'exposition chronique au bisphénol A (BPA) –contaminant alimentaire- sur la réponse inflammatoire et la perméabilité paracellulaire dans le côlon : étude *in vivo* et *in vitro*
- Lara MOUSSA, **M2R EQSA** (ENSA, Toulouse)
Projet: Evaluation des effets bénéfiques du germe de soja sur la fonction de barrière intestinale: rôle des isoflavones
- 2006/07 Viorica BRANISTE, **M2R Physiopathologie** (UPS, Toulouse)
Projet: **I.** Evaluation des effets d'exposition chronique aux Phthalates –contaminants des emballages alimentaires- sur la physiologie de la barrière intestinale et les états inflammatoires du côlon

- 1999/00 Pierre RAYNAL, **DEA de Sciences Chirurgicales** (Paris-Sud)
Interne de Gynécologie/Obstétrique en 7^{ème} semestre (Caen)
Projet: Etude des mécanismes réflexes mis en jeu dans la pratique de l'insémination artificielle et du transfert d'embryons chez la brebis. Etude télémétrique et approche pharmacologique
- 1998/99 Emmanuel BARRANGER, **DEA de Sciences Chirurgicales** (Paris-Sud)
Interne de Gynécologie/Obstétrique en 7^{ème} semestre (Cochin Port-Royal, Paris)
Projet: Relations anatomiques entre innervations sensitive et motrice du tractus génital chez la rate: implications fonctionnelles dans le contrôle de la motricité utéro-cervicale

Autres stages encadrés,

- 2007 Lucile Chemin (3^{ème} année Ingénieur), 3 mois, Institut Polytechnique LaSalle, Beauvais
2006 Arnaud Fabre (3^{ème} année Ingénieur), 3 mois, EI Purpan, Toulouse
2006 Yannick Leboulch (1^{ère} année Vétérinaire), 1 mois, ENV Toulouse
2001 Guillaume Soubigou (Technicien), CDD de 6 mois, SANOFI-SYNTHELABO

Expertise scientifique

Referee pour le compte des revues,

FEBS Lett; J Clin Gastroenterol (2010-11) - Regulatory Peptides (2009) - Hepatology; The Journal of Pharmacy and Pharmacology (2007) - British Journal of Pharmacology (2005) - The Journal of Histochemistry and Cytochemistry (2004) – Neuroscience (2003) - Autonomic Neuroscience (2002) - Cell and Tissue Research; The Journal of Comparative Neurology (2001).

Expert ANR,

Pour le compte de l'appel à projets 2009 **ALIA** (ALIMENTATION ET INDUSTRIES ALIMENTAIRES).

Membre de Jury de Concours

ENV Toulouse,

- Membre permanent de jury de sélection AERC *et* de concours « Maître de Conférence » depuis 2008.

INRA,

- Jury de concours AJT Département AlimH (2008).

Divers

Sociétés scientifiques,

- Membre international de l'*American Gastroenterological Association* (AGA) depuis 2008.
- Membre du *Club Français de Motricité Digestive* (CFMD) depuis 2007.
- Membre de la *Société des Neurosciences* (SDN) de 1999 à 2009.

LISTE DES PUBLICATIONS

... et autres productions d'intérêt pédagogique ou sociétal

Articles de recherche (22 articles dans des revues à comité de lecture)

2010

Agostini S, Eutamene H, Cartier C, Broccardo M, Improta G, Houdeau E, Petrella C, Ferrier L, Theodorou V, Bueno L. Evidence of Central and Peripheral Sensitization in a Rat Model of Narcotic Bowel Like-Syndrome. *Gastroenterology*, 139(2):553-63.

Braniste V, Jouault A, Gaultier E, Polizzi A, Buisson-Brenac C, Leveque M, Martin PG, Theodorou V, Fioramonti J, Houdeau E. Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(1): 448-53.

2009

Braniste V, Leveque M, Buisson-Brenac C, Bueno L, Fioramonti J, Houdeau E. Oestradiol decreases colonic permeability through oestrogen receptor beta-mediated up-regulation of occludin and junctional adhesion molecule-A in epithelial cells. *J Physiol (London)*, 587: 3317-28.

Ait-Belgnaoui A, Eutamène H, Houdeau E, Bueno L, Fioramonti J. *Lactobacillus farciminis* treatment attenuates stress-induced overexpression of Fos protein in spinal and supraspinal sites after colorectal distension in rats. *Neurogastroenterol Motil*, 21: 567-73.

2008

Barreau F, Salvador-Cartier C, Houdeau E, Bueno L, Fioramonti J. Long term alterations of colonic nerve mast cell interactions induced by neonatal maternal deprivation in rats. *Gut*, 57(5): 582-590.

Houdeau E, Furstoss V, Forgerit Y, Bonné JL, Leboeuf B. Short time insemination with frozen semen increases fertility rate in nulliparous dairy goats. *Animal*, 2(10): 1496-1500.

Dupuis M, Houdeau E, Mhaouty-Kodja S. Increased potency of α 1-adrenergic receptors to induce inositol phosphates production correlates with the up-regulation of α 1d/Gh α /phospholipase C δ 1 signaling pathway in term rat myometrium. *Reproduction*, 135(1):55-62.

2007

Houdeau E, Moriez R, Levèque M, Salvador-Cartier C, Waget A, Leng L, Bueno L, Bucala R, Fioramonti J. Sex steroid regulation of macrophage migration inhibitory factor in normal and inflamed colon in the female rat. *Gastroenterology*, 132(3):982-93.

2005

Houdeau E, Larauche M, Monnerie R, Bueno L, Fioramonti J. Uterine motor alterations and estrous cycle disturbances associated with colonic inflammation in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288(3):R630-7.

Houdeau E, Levy A, Mhaouty-Kodja S. Up-regulation of rat myometrial phospholipases Cb1 and Cb3 correlates with increased term sensitivity to carbachol and oxytocin. *J Endocrinol*, 187(2):197-204.

2004

Raynal P, Houdeau E. Comparison of the uterine reflex activity during artificial insemination and mating in the ewe. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 33(8):725-33.

Mhaouty-Kodja S, Houdeau E, Legrand C. Regulation of myometrial InsP production and uterine contraction by b-adrenergic receptors in mid-pregnant rat. *Biol Reprod*, 70(3):570-6.

2003

Houdeau E, Rossano B, Prud'homme M-J. Regional and muscle layer variations in cholinergic nerve control of the rat myometrium during the oestrus cycle. *Auton Neurosci-Basic*, 104(1): 1-9.

2002

Houdeau E, Barranger E, Rossano B. Do sensory calcitonin gene-related peptide nerve fibres in the rat pelvic plexus supply autonomic neurons projecting to the uterus and cervix? *Neuroscience Lett*, 332(1): 29-32.

Houdeau E, Raynal P, Marnet P-G, Germain G, Mormède P, Rossano B, Monnerie R, Prud'homme M-J. Plasma levels of cortisol and oxytocin, and uterine activity after cervical artificial insemination in the ewe. *Reprod Nutr Dev*, 42(4) : 381-392.

2001

Mhaouty-Kodja S, Houdeau E, Cohen-Tannoudji J, Legrand C. Catecholamines are not linked to phospholipase C pathway and uterine contraction in late pregnant mouse. *J Physiol (London)*, 536(1): 123-131.

1999

Prud'homme M-J, Houdeau E, Serghini R, Tillet Y, Schemann M, Rousseau J-P. Small Intensely Fluorescent (SIF) cells of the rat paracervical ganglion synthesize adrenaline, receive afferent innervation from postganglionic cholinergic neurones, and contain muscarinic receptors. *Brain Res*, 821: 141-149.

1998

Houdeau E, Rousseau A, Meusnier C, Prud'homme M-J, Rousseau J-P. The sympathetic innervation of the upper and lower regions of the uterus and cervix in the rat have different origins and routes. *J Comp Neurol*, 399(3): 403-412.

Houdeau E, Prud'homme M-J, Rousseau J-P. Regional difference in the distribution of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerve fibres along the uterus and between myometrial muscle layers in the rat. *Histochem J*, 30(7): 525-529.

1997

Houdeau E, Boyer P-A, Rousseau A, Rousseau J-P. Coexpression of neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in pelvic plexus neurones innervating the uterus and cervix in the rat. *Cell Tissue Res*, 288: 285-292.

1995

Houdeau E, Prud'homme M-J, Rousseau A, Rousseau J-P. Distribution of noradrenergic neurons in the female rat pelvic plexus and involvement in the genital tract innervation. *J Auton Nerv Syst*, 54: 113-125.

1994

Houdeau E, Boyer P-A. In situ hybridization study of neuropeptide Y in the rat brain and pelvic paracervical ganglion. *Cell Tissue Res*, 277: 579-586.

Article de Revue

2011

Houdeau E. Perturbateurs endocriniens et contamination orale: l'intestin oublié. *Med Long*, sous presse.

Chapitres d'ouvrage

2011

Braniste V, Audebert M, Zalko D, Houdeau E. Bisphenol A in the gut : another break in the wall? *Dans : RESEARCH AND PERSPECTIVES IN ENDOCRINOLOGY : MULTI-SYSTEM ENDOCRINE DISRUPTION.* Editeurs : Fondation IPSEN. Springer, Berlin, sous presse.

2001

Houdeau E., Prud'Homme M-J, Rampin O, Rousseau J-P, Schirar A. Innervation de l'appareil génital : organisation anatomique, nature et fonctions. *Dans : LA REPRODUCTION CHEZ LES MAMMIFÈRES ET L'HOMME.* Editeurs : Thibault C & Levasseur M-C. INRA Ellipses, Paris, pp 425-45.

Presse professionnelle "Santé & Alimentation"

2010

Houdeau E. Bisphénol A, le plastique en toute sécurité? *Dossier : L'EAU DANS TOUS SES ÉTATS.* *Dans : PRATIQUES EN NUTRITION, Octobre-Décembre 2010, n°24.* Elsevier Masson, pp 30-35.

Conférences (sur invitations)

2010

"Bisphenol A in the gut : another break in the wall?", *Multi-System Endocrine Disruption*, 10th Colloque Médecine et Recherche-Endocrinologie, IPSEN, Paris, 29 novembre 2010.

"Perturbateurs endocriniens et fonction intestinale", *Les perturbateurs endocriniens : changement de paradigme dans l'évaluation des risques sanitaires et environnementaux*, Assemblée Nationale, Paris, 14 septembre 2010.

"Bisphénol A : le plastique en toute sécurité?", *12^{ème} Entretiens de Nutrition*, Institut Pasteur, Lille, 4 juin 2010.

2009

"Contrôle oestrogénique de la cellule épithéliale colique: du cycle sexuel aux perturbateurs endocriniens", *Homéostasie de l'épithélium digestif*, IFR de Recherche Bio-Médicale de Toulouse, Hôpital Purpan, décembre 2009.

2008

"Contrôle endocrine des pathologies intestinales: influence de la balance oestro-progestative", *Rencontre IMAD* (Institut des Maladies de l'Appareil Digestif), CHU Hôtel Dieu, Janvier 2008, Nantes.

Communications orales (congrès internationaux)

Moussa L, Grimaldi C, Paul, F Braniste V, Tondereau V, Eutamene H, Bueno L, Fioramonti J, Houdeau E, Theodorou V. Protective Effect of a Phytoestrogen-Enriched Diet on the Increase in Visceral Sensitivity and Intestinal Permeability Induced by Acute Stress in Female Rats . **Digestive Disease Week 2010**, 1-5 mai, New Orleans, USA.

Braniste V, Leveque M, Bueno L, Fioramonti J, Houdeau E. Effect of chronic oral exposure to the xenoestrogen bisphenol A (BPA) on epithelial paracellular permeability and inflammatory response in the rat colon. **Digestive Disease Week 2008**, 15-22 mai, San Diego, USA. **Résumé publié dans: *Gastroenterology***, 2008, 134(4): A36-A36 Suppl.

Braniste V, Levèque M, Bueno L, Fioramonti J, Houdeau E. Effects of chronic dietary exposure to the xenoestrogens diethylhexyl phthalate (DEHP) and bisphenol A (BPA) on intestinal barrier function and inflammatory response in the rat colon. **15th United European Gastroenterology Week (UEGW 2007)**, 27-31 octobre 2007, Paris. **Résumé publié dans: *Gut***, 3(56): A51 Suppl.

Contributions à l'interaction Sciences-Société

1/ Presse écrite :

- **Le Monde**, 16 déc 2009 : Le bisphénol A présent dans les plastiques agit, même à faible dose, sur l'intestin.
- **Le Figaro**, 16 déc 2009 : Bisphénol A, toxique aussi pour les intestins.
- **Le Soir** (Bruxelles), 16 déc 2009 : Le Bisphénol A agit dès l'intestin.
- **Ouest France**, 16 déc 2009 : Le Bisphénol A prouvé nocif pour l'intestin.
- **Le Figaro**, 12 fév 2010 : Les biberons au bisphénol A doivent-ils être interdits ?
- **Sciences & Vie**, mensuel fév 2010: Le Bisphénol A attaque l'intestin.
- **Le Nouvel Observateur**, hebdomadaire 7 janv 2010: Dangereux Bisphénol A.
- **Top Santé**, mensuel mars 2010 : Bisphénol A, le repérer pour l'éviter.
- **Que Choisir**, mensuel mai 2010 : Un plastique pas fantastique.
- **Valeurs vertes**, trimestriel n° 102, janv-fév 2010 : Emballages plastiques : les dangers du bisphénol A.
- **Nutrition infos**, trimestriel n° 13, sept 2010: Boire ou ne pas boire... d'eau?
- **Profession Gynécologue**, octobre 2010 : Les perturbateurs endocriniens.

2/ Télévision :

- **TSR1 (Radio Télévision Suisse), Documentaire 360°** (30 min), « Bisphénol A: faibles doses, gros soucis », 9 mars 2011.
- **TF1 – JT 20h**, 10 août 2010.
- **ARTE, Documentaire Théma** (30 min), « L'emballage qui tue », 27 juil 2010.
- **France 3 - 19<20 Edition Midi-Pyrénées**, 11 mai 2010.
- **France 2 - JT 13h**, 9 fév 2010.
- **TLT – Le Journal**, 18 déc 2009.
- **FR3 Toulouse - Midi Pile**, 15 déc 2009.
- **France 5 - Le Magazine de la Santé**, mai 2008 et 15 déc 2009.

3/ Radios :

- **France Inter – Journal 13h**, 10 août 2010.
- **Radio France International – Journal**, déc 2009.

4/ *Médias internet* :

- **La Nutrition.fr** – <http://www.lanutrition.fr/bien-dans-sa-sante/environnement/contaminants-alimentaires/le-bisphenol-a/le-bisphenol-a-est-aussi-toxique-pour-les-intestins.html>
<http://www.lanutrition.fr/bien-dans-sa-sante/environnement/contaminants-alimentaires/le-bisphenol-a/eric-houdeau-lintestin-est-tres-sensible-aux-faibles-doses-de-bisphenol-a.html>

5/ *Réunion publique* :

- **Saint-Jean**, H^{te}-Garonne – Bisphénol A : l'appel des maires et des scientifiques. La dépêche du midi. 22 février 2010. <http://www.ladepeche.fr/article/2010/03/05/789851-Saint-Jean-Bisphenol-A-l-appel-des-maires-et-des-scientifiques.html>

INTRODUCTION GÉNÉRALE

... au fil des hormones

Bien qu'ayant suivi une formation universitaire pour l'essentiel basée sur la fonction de reproduction, passant de l'endocrinologie à la neurophysiologie de l'appareil génital, mâle et femelle, mon parcours professionnel depuis mon recrutement à l'INRA m'a amené en quelques années à m'intéresser à la place des hormones sexuelles dans des fonctions de l'organisme qui, de prime abord, n'avaient pas de raisons physiologiques d'être sensibles à la balance plasmatique entre oestrogènes, progestérone et androgènes.

L'importance de la place qu'occupent les stéroïdes sexuels dans l'organisme parmi les autres facteurs hormonaux se mesure dans la variété d'impacts chez l'animal et l'homme, depuis l'ontogenèse, l'apparition des caractères sexuels secondaires, la puberté, les années de fertilité et la ménopause/andropause, jusqu'aux effets avérés dans l'ostéogenèse, le transit intestinal, ou encore la perception de la douleur et le stress... C'est chez la femelle que l'influence du statut hormonal est la plus évidente. Ces effets sont marqués par les alternances de la balance plasmatique oestro-progestative liées au cycle sexuel (oestral ou menstruel), les plus ou moins longues périodes d'imprégnation de la progestérone pendant la gestation (variables selon les espèces), et toujours placés sous le signe de changements profonds impliquant des régulations dès l'étage du gène. Si nous nous intéressons aux influences des hormones stéroïdes sexuelles dans l'organisme, quelle que soit l'espèce, chaque individu doit être considéré par son âge (du nouveau-né à l'adulte), son environnement, son alimentation (e.g. perturbateurs endocriniens, compléments alimentaires d'origine végétale)... il doit aussi être systématiquement replacé dans le contexte de vie de son organisme, tout particulièrement chez la femelle, comme la puberté, la période du cycle sexuel (phase folliculaire ou lutéale), l'avancée de la gestation (début, mi-stade ou terme) ou encore le post-partum... chacune de ces périodes étant placée dans un contexte hormonal adapté, mais particulièrement versatile.

Exceptée une incartade en DEA au *Muséum National d'Histoire Naturelle* de Paris, au laboratoire d'Ichtyologie Générale et Appliquée (ma seule période de travail sur l'appareil génital mâle... *de poisson*), j'ai réalisé ma thèse puis mes premières années de chercheur à l'INRA sur le tractus génital femelle, en y abordant sous plusieurs angles les régulations nerveuses de la contractilité utérine. Mon travail de thèse a été réalisé à l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI) dans le laboratoire de Physiologie de la Reproduction dirigé par René Ozon, sous la direction du Professeur Jean-Paul Rousseau (*groupe "Neurophysiologie"*). Cette unité de recherche étant affiliée à l'INRA, au Département *Physiologie Animale*, le choix du sexe dans mes travaux était guidé par l'Institut considérant la femelle -matrice- comme à l'origine de problèmes dans la conduite de la reproduction dans les filières. Le choix de l'espèce -le rat femelle- comme modèle d'étude, n'a par contre pas fait l'unanimité, mais a été facile à défendre *in fine* au concours de recrutement, car les fenêtres d'imprégnation hormonale caractéristiques du cycle oestral, de la période d'implantation ou du terme sont tout à fait semblables à celles d'espèces d'intérêt agronomique (ovins, caprins, porcins). Dès le début de la thèse j'ai été guidé par Jean-Paul Rousseau pour développer une recherche à caractère plus fondamental qu'appliqué. Il m'a convaincu que la compréhension des régulations nerveuses de l'appareil génital, dans un contexte hormonal précis, passait nécessairement par une neuroanatomie fiable. Il m'a surtout laissé les mains libres pour apprendre et développer les outils nécessaires à cette démarche, comme la chirurgie expérimentale (dénervation sélective chez l'animal anesthésié), le rétro-marquage des voies nerveuses (motrices et sensibles), l'immunocytochimie et enfin l'hybridation *in situ*. Pour cette dernière, j'ai entamé une collaboration quasi quotidienne avec le laboratoire de

« Neurobiologie des Signaux Intercellulaires » du professeur André Calas, co-fondateur de l'Institut des Neurosciences du CNRS à Paris 6, et pionnier en France dans le développement de l'hybridation *in situ* sur le système nerveux central. Nous avons été les premiers à appliquer cette technique à une structure ganglionnaire autonome peu connue -le plexus pelvien ou ganglion paracervical- situé au contact de l'appareil génital et véritable *carrefour* des informations périphériques et centrales (*i.e.* d'origine spinales et supraspinales).

Durant cette période, j'ai été soutenu par les professeurs Chantal Legrand et Jean-Paul Maltier qui travaillaient sur la signalisation adrénérgique de la contractilité utérine, essentiellement assurée par l'innervation autonome. Dans l'ensemble, le sujet qui m'avait été confié m'a permis d'étudier les relations entre le muscle utérin, les nerfs extrinsèques et les ganglions autonomes périphériques. Ce support neuroanatomique s'est avéré par la suite essentiel pour distinguer des voies de contrôle entre les régions haute et basse de l'utérus¹, avec un niveau de complexité supérieur chez les animaux de rente, où l'utérus est bipartite et les espèces souvent polytoques, comme chez la rate. Ces résultats m'ont de plus révélé une partie du vaste champ de recherche et des expériences à mener pour mieux comprendre comment le système nerveux autonome -surtout ses activités réflexes- pouvait faire barrage dans les pratiques zootechniques des filières, que sont l'insémination artificielle (IA) et le transfert d'embryons (TE).

Après avoir réalisé cette *cartographie* de l'innervation autonome dans l'appareil génital femelle, j'ai rejoint lors de mon recrutement en 1997 le laboratoire de Neurobiologie des Fonctions Végétatives, également dirigé par Jean-Paul Rousseau, à l'INRA de Jouy-en-Josas. Le recrutement exigeait une orientation différente, plus fonctionnelle, ce qui m'a conduit à proposer de mettre en rapport l'organisation anatomo-fonctionnelle de l'innervation utérine avec des préoccupations d'ordre agronomique, que sont les résultats insatisfaisants de l'IA et du TE par les voies naturelles. Des travaux sur *animal de rente* étant difficiles à mettre en place dans un premier temps, deux orientations étaient possibles dans un modèle rongeur :

1/ s'intéresser à l'étage spinal (siège des voies réflexes) par des approches d'électrophysiologie *ex vivo*, en relation avec l'activité globale de l'utérus *in situ* chez l'animal anesthésié, sans distinction des couches myométriales et des parties haute et basse du tractus²,

2/ identifier les neuromédiateurs et les voies de signalisation intracellulaire impliqués dans l'activité des deux couches musculaires de l'utérus (couches externe longitudinale et interne circulaire), en utilisant les techniques de pharmacologie *in vitro* en bain d'organes, dans différentes imprégnations hormonales spécifiques du cycle sexuel, de la gestation et de la parturition.

J'ai pour ma part favorisé la seconde approche, la seule permettant d'aborder la complexité des interactions entre différentes substances (neurotransmetteurs et neuromodulateurs) libérées ou non par de mêmes fibres nerveuses (notion de colocalisation), les contrôles distincts entre les deux couches musculaires aux deux extrémités de l'organe (jamais abordé dans la littérature) et l'influence de la balance oestro-progestative (animal cyclé ou castré puis supplémenté en stéroïdes). Ma collègue Marie-Jeanne Prud'homme ayant continué les approches neuroanatomiques, j'ai eu en charge de développer dans l'unité les outils de la

¹ la région antérieure de l'utérus est plutôt spécialisée dans la distribution intra-utérine des blastocystes (premier stade embryonnaire) et leur implantation pour la gestation, la partie postérieure dans le transport des gamètes mâles vers le site de fécondation, ou encore l'ouverture du col utérin et l'expulsion des nouveau-nés à la parturition.

² ce volet technique avait été mis en place dans l'unité par Olivier Rampin, pour l'étude du contrôle spinal de l'érection dans le modèle rat.

pharmacologie et de l'électrophysiologie *in vitro*, aidé par Guy Germain (CR1 INSERM) dont des travaux s'articulaient sur de mêmes questions, mais dans un modèle primate.

Durant la période 1998-2002, ces études ont été l'occasion de travailler avec Chantal Legrand (Professeur, Université Paris VI) et Sakina Mhaouty-Kodja (CR1 CNRS, Université Paris VI puis Collège de France) sur la régulation hormonale des systèmes *phospholipase C* myométriaux, pour caractériser les paramètres responsables de la reprise d'activité utérine à terme de gestation. C'est aussi en 1999 que j'ai abordé une étude sur *gros animal*, en mettant tout d'abord au point une technique d'enregistrement télémétrique de l'activité utérine chez la rate éveillée (utilisée par G. Germain chez les primates), avant de la transposer chez la brebis. En encadrant Pierre Raynal (DEA), interne de gynécologie-obstétrique, j'ai proposé de caractériser point par point les voies réflexes mises en jeu dans la pratique de l'IA dans cette espèce, en combinant la télémétrie à la pharmacologie, pour les comparer à celles apparaissant dans la situation naturelle de l'accouplement. Des différences majeures étant apparues, de l'année 2000 jusqu'en 2004, d'autres travaux ont été entrepris chez la chèvre avec Bernard Leboeuf (IR, INRA Poitiers), à la fois dans les unités expérimentales de l'INRA et chez les éleveurs, pour identifier dans les gestes techniques de l'IA des facteurs éventuellement responsables des faibles taux de fertilité constatés chez les nullipares.

En 2002, à la fermeture du laboratoire de Neurobiologie des Fonctions Végétatives, il m'a été proposé d'intégrer l'unité naissante de Neurobiologie de l'Olfaction et de la Prise Alimentaire (NOPA) à Jouy-en-Josas. Les activités de cette unité étant cependant trop éloignées de mes travaux antérieurs, j'ai eu l'opportunité de rejoindre l'unité de Neuro-Gastroentérologie et Nutrition à Toulouse, dirigée par Jean Fioramonti, dans le Département *Alimentation Humaine*, dès janvier 2003. En accord avec mon Département d'origine, cette mobilité était motivée par un contexte commun de recherche, où mes compétences en neurophysiologie et en endocrinologie pouvaient facilement se transposer au système nerveux entérique et la physio-pathologie de la barrière intestinale. Les travaux de l'unité avaient déjà abordé l'influence de l'oestradiol et de la progestérone dans les troubles fonctionnels de l'intestin, comme le syndrome de l'intestin irritable (SII). Lorsque j'ai proposé de reprendre ces questions dans un projet plus large sur l'influence de la balance hormonale plasmatique dans la plasticité épithéliale, les systèmes immunitaire et nerveux, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), je ne mesurais pas les répercussions que pouvait avoir la fonction de reproduction sur le tractus gastrointestinal voisin. Je ne mesurais pas non plus à quel point une activité inflammatoire dans le côlon pouvait s'accompagner de troubles fonctionnels de l'utérus, affectant la fertilité, et impliquant des interactions délétères entre cytokines et stéroïdogénèse ovarienne.

Dans ce mémoire, les deux périodes sont abordées de façon distinctes, car trop éloignées au plan des recherches, mais je vais essayer de vous persuader que cette diversité d'activités depuis mon recrutement à l'INRA a été un atout pour développer des projets novateurs dans le contexte des relations entre statut hormonal et paroi intestinale. A cette fin, le présent rapport tentera d'exposer en quoi les recherches en cours et à venir s'appuient sur des compétences acquises depuis la thèse... *au fil des hormones*.

INNERVATION AUTONOME et FONCTION DE REPRODUCTION : *origines, distribution et rôles de l'innervation dans le myomètre*

L'innervation de l'appareil génital chez les mammifères et l'homme est assurée par le système nerveux autonome. Il est constitué de fibres nerveuses efférentes (quittant le névraxe) et afférentes (arrivant au névraxe) : les premières assurent une commande motrice viscérale tandis que les secondes transmettent l'information sensitive de la périphérie vers l'axe cérébro-spinal. Ces fibres courent dans un réseau complexe de nerfs et de ganglions (les plexus) reliant l'appareil génital à la moelle épinière ou au bulbe rachidien. Dans les organes, elles parcourent la paroi musculaire, sont présentes autour des vaisseaux sanguins et au voisinage de cellules sécrétrices (glandes endométriales, prostate, vésicules séminales). Les études *in vitro* et *in vivo* montrent que l'innervation participe au contrôle de la motricité génitale (déterminée par l'activité de la paroi musculaire des organes), du débit vasculaire (vasoconstriction ou vasodilatation) et des sécrétions. Il existe une grande diversité de neuromédiateurs et de neuropeptides dans les fibres nerveuses, en associations variées selon qu'il s'agit d'efférences ou d'afférences. Les effets spécifiques et combinés de ces substances à la périphérie, souvent influencés par les stéroïdes sexuels, rendent difficile la compréhension physiologique des régulations nerveuses des fonctions génitales [extrait de : Houdeau *et al* (2001), La reproduction chez les mammifères et l'homme. *Editeurs* : Thibault C & Levasseur M-C. INRA Ellipses, Paris, pp 425-45].

2.1. Activité utérine et innervation: introduction aux travaux de recherche

2.1.a. Origine de l'innervation autonome et sensitive de l'utérus : un débat

Un peu d'histoire...

Depuis les travaux de Claude Bernard (1813-1878), médecin et physiologiste français, l'interruption de nerfs par voie chirurgicale ou chimique (*e.g.* curarisation) a souvent été utilisée pour apprécier l'importance des régulations nerveuses (sensorielles et motrices) dans une fonction d'organe. Pour la sphère pelvienne, les mêmes approches ont été utilisées à la fin du XIX^e siècle avec les travaux de Langley et Anderson chez le chat et le lapin (1895-96), établissant les principes fondamentaux d'anatomie des voies nerveuses sympathiques (ou orthosympathiques) et parasymphatiques des organes urogénitaux. C'est en 1867 que fut décrit pour la première fois le plexus de Frankenhäuser (ou ganglion *uterinum* : **Fig 1**), une structure ganglionnaire bilatérale située dans la région paracervicale de l'utérus (*i.e.* à la jonction du col utérin avec le vagin), où convergent les fibres nerveuses sympathiques et parasymphatiques (respectivement par les nerfs hypogastriques et sacrés) avant de se projeter aux organes pelviens (**Fig 1**).

Depuis cette première description du ganglion (*uterinum*) paracervical (GPC, ou encore ganglion pelvien) et de son homologue chez le mâle (accolé à la prostate), tout un pan de la littérature jusqu'aux années 80 a été dédié aux territoires innervés dans le tractus génital, urinaire et le côlon, ainsi qu'au rôle de la noradrénaline (NA) et de l'acétylcholine (ACh) (respectivement neurotransmetteur principal des fibres sympathiques et parasymphatiques) dans le contrôle des fonctions vasculaires, motrices et de sécrétion. Ce sont tout d'abord les techniques histologiques de marquage à l'acétylcholinestérase (AChE) et de fluorescence des catécholamines (technique dite de « Falck et Hillarp ») qui ont permis une première description de la distribution des fibres noradrénergiques et cholinergiques dans l'utérus, les oviductes et les ovaires (Kanerva *et al*, 1972). Le développement des outils de l'immunohistochimie au début des années 80 a précisé cette organisation. C'est avec le

développement progressif d'une véritable *banque* d'anticorps de plus en plus spécifiques, d'abord polyclonaux puis monoclonaux, que s'est définie la notion de colocalisation de la NA et de l'ACh avec d'autres substances neuromodulatrices, majoritairement de nature peptidergique comme le neuropeptide Y (NPY) ou le peptide vasoactif intestinal (VIP). D'autres peptides, plutôt localisés dans le contingent des afférences sensibles, ont progressivement fait leur apparition au cours des décennies 80-90, comme la substance P (SP), le *calcitonin gene-related peptide* (CGRP) ou encore la galanine (GAL). En parallèle, les outils de la pharmacologie (agonistes et antagonistes), utilisés *in vivo* (injection systémique) ou *in vitro* (bain d'organe isolé), et de l'électrophysiologie (chez l'animal anesthésié ou par la stimulation transmurale en bain d'organe) ont défini les bases fonctionnelles du contrôle moteur des musculatures lisses vasculaires et extravasculaires (*revue dans* Papka et Traurig, 1993).

.... un réseau complexe de nerfs et de ganglions...

Pour l'utérus, les voies nerveuses efférentes, qu'elles soient sympathiques ou parasympathiques, proviennent de la moelle épinière et se composent de deux neurones en série, qualifiés respectivement de pré- et de postganglionnaire. Les premiers ont leur corps cellulaire localisé dans la colonne intermédiolatérale de la moelle et contiennent l'ACh comme principal neuromédiateur (**Fig 2**). Ces neurones sont regroupés dans les segments médullaires thoraco-lombaires pour l'innervation sympathique, et les segments sacrés³ pour l'innervation parasympathique (**Figs 2 et 3**). Ils font synapse dans les ganglions périphériques avec les neurones postganglionnaires, de nature cholinergique pour les efférences parasympathiques et noradrénergique pour les efférences sympathiques (**Fig 3**).

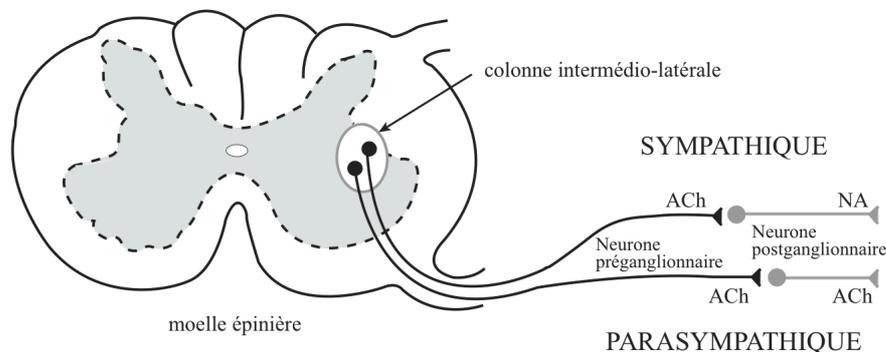


Figure 2 Représentation schématique des voies efférentes sympathique et parasympathique du système nerveux autonome.

(extrait de Houdeau *et al*, La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme - 2001)

Les axones préganglionnaires sympathiques quittent la moelle par les racines ventrales et la plupart font synapse avec des neurones postganglionnaires noradrénergiques situés dans les ganglions de la chaîne paravertébrale, le plexus cœliaque ou encore le plexus hypogastrique (ganglion mésentérique inférieur ou GMI). D'autres axones traversent ce dernier et cheminent dans les nerfs hypogastriques pour se projeter sur des neurones noradrénergiques présents dans les ganglions pelviens (**Fig 3**). Un dernier contingent d'axones préganglionnaires emprunte la chaîne paravertébrale jusqu'au niveau lombo-sacré. De là, les axones des

³ Chez le rat toutefois, le dernier segment lombaire (L6) contient une part substantielle des neurones préganglionnaires parasympathiques à destinée génitale.

neurones postganglionnaires courent dans les nerfs pelviens et/ou les nerfs honteux pour atteindre l'appareil génital (**Fig 3**).

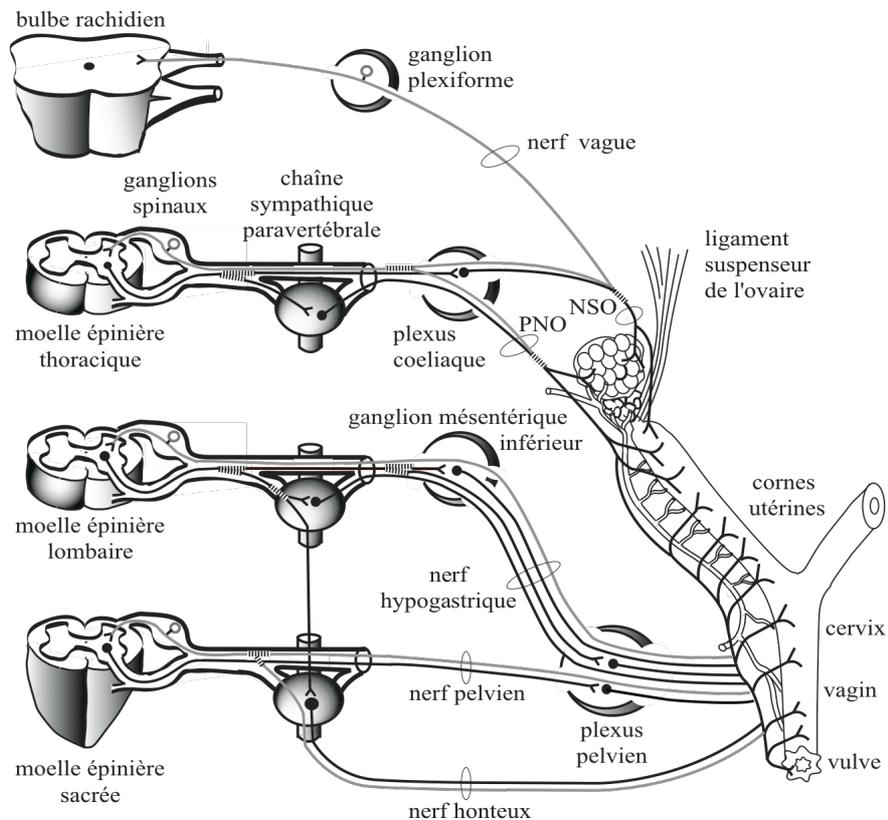


Figure 3

Organisation extrinsèque de l'innervation efférente (noir) et afférente (gris) de l'appareil génital femelle (rat). PNO: plexus nerveux ovarien; NSO: nerf supérieur ovarien.

(extrait de Houdeau *et al*, la Reproduction chez les Mammifères et l'Homme - 2001)

Pour l'innervation parasympathique, le trajet des axones préganglionnaires est beaucoup plus simple. En quittant la moelle épinière sacrée, ils empruntent le trajet des nerfs sacrés pelviens pour faire synapse avec des neurones cholinergiques situés dans les plexus ganglionnaires pelviens (**Fig 3**). Ce relais ganglionnaire est donc un carrefour essentiel pour l'innervation efférente de l'appareil génital, car composé d'une population mixte de neurones postganglionnaires, noradrénergiques et cholinergiques (en proportion variable selon les espèces et le sexe) (**Fig 4**). Son organisation anatomique est très hétérogène selon les espèces. Il est constitué dans sa structure la plus simple (rongeurs) d'un ganglion bien individualisé situé de part et d'autre (*i.e.* une structure paire) de la jonction utéro-vaginale chez la femelle (ganglion paracervical *ou* GPC) (**Fig 4A**). Il se présente par contre sous la forme d'un plexus chez les autres mammifères (petits ganglions dispersés dans les lames sacro-pubiennes ; **Fig 5**), atteignant son maximum de complexité chez l'homme.

Le troisième et dernier contingent des fibres nerveuses utérines est constitué par les afférences sensibles. Elles véhiculent l'information périphérique vers la moelle épinière (afférences spinales) et ont leur corps cellulaire localisé dans les ganglions spinaux des racines dorsales thoraciques, lombaires et sacrées (*i.e.* ganglions rachidiens) (**Fig 3**). Leurs axones cheminent dans les mêmes nerfs que les fibres motrices sympathiques et parasympathiques. La sensibilité des organes génitaux externes est transmise par les fibres

afférentes des nerfs honteux et des nerfs pelviens, celle des organes génitaux internes l'est par les nerfs pelviens et hypogastriques. Chez la femelle, la participation des nerfs pelviens à l'innervation sensitive décroît du vagin vers l'utérus au profit de fibres cheminant dans les nerfs hypogastriques, puis dans les nerfs ovariens pour la région antérieure de l'utérus, les oviductes et les ovaires. Les nerfs vagues (X^{ème} paire de nerfs crâniens) contribuent à l'innervation sensitive des ovaires, de l'utérus et du col (au moins chez la rate) (**Fig 3**). Ces afférences vagales ont leurs corps cellulaires dans les ganglions plexiformes (*nodose ganglia* pour les anglo-saxons) et permettent une intégration directe de l'information périphérique vers les centres nerveux supérieurs.

.... *malgré tout un débat,*

Les études portant sur l'innervation de l'appareil génital femelle étaient motivées par des perspectives pharmacologiques de maîtrise de la contractilité utérine sous différentes imprégnations hormonales (cycle sexuel ou gestation), dans le traitement des menaces d'accouchement prématuré, la procréation médicalement assistée (PMA) ou encore pour déterminer le rôle des voies motrices dans les mécanismes d'initiation des contractions menant à la parturition.

Bien que des différences inter-espèces existent, il existait encore au début de mes travaux de thèse une controverse quant aux origines et trajets de nerfs empruntés par l'innervation sympathique de l'utérus et du cervix. Des auteurs ont suggéré que la majeure partie de ces fibres noradrénergiques se projette sur l'appareil génital depuis la région caudale de l'utérus en suivant le trajet des nerfs hypogastriques. Cette innervation aurait pour origine des corps cellulaires postganglionnaires situés dans le GMI et les ganglions lombaires de la chaîne paravertébrale sympathique, complétée par un dernier contingent de fibres issues de neurones noradrénergiques des ganglions pelviens (chat: Rosengren et Sjöberg, 1967; rat: Kanerva *et al*, 1972). D'autres ont proposé une innervation sympathique essentiellement apportée par les nerfs ovariens, donc rostrale et totalement indépendante des nerfs hypogastriques et des ganglions pelviens (cobaye: Kulkarni *et al*, 1976). Enfin, quelques études ont conclu à une innervation faisant intervenir chacune de ces *sources*, en proportion variable selon les auteurs (cobaye: Thorbert *et al*, 1977; Bell et Malcom, 1978).

Ce qui peut paraître ici comme une joute entre auteurs restait important à préciser, en particulier lorsque l'on sait que les régions haute et basse de l'utérus -qu'il soit simplex (primates) ou à deux cornes (espèces d'élevage, souris, rat...)- se distinguent au plan moteur par une extrémité rostrale plutôt spécialisée dans la descente des blastocystes et leur répartition à la nidation, tandis que la motricité à l'extrémité caudale est essentielle à la remontée des gamètes mâles vers le site de fécondation (trompes ou oviductes), ou à la parturition (expulsion d'un ou plusieurs fœtus). Dans les oviductes, l'utérus et le cervix, plus de 90% de la noradrénaline tissulaire est d'origine nerveuse (Maltier *et al*, 1987), et les études pharmacologiques ont clairement mis en évidence le rôle de la NA dans le contrôle moteur de ces organes, entre relaxation et contraction du muscle lisse (*i.e.* respectivement nécessaire pour un utérus quiescent pendant la gestation, puis à la reprise des contractions à terme de grossesse). Ces effets dépendent de la nature et la densité des récepteurs adrénergiques, α 1-contracturants ou β -relaxants, à la surface des cellules musculaires. Quant à l'innervation cholinergique (*i.e.* postganglionnaire parasympathique), elle a souvent été le parent pauvre tant dans sa description neuroanatomique que fonctionnelle. Comme dit plus haut, les ganglions pelviens en seraient la source essentielle pour l'ensemble de l'utérus et les oviductes, alors que les ovaires recevraient une innervation plutôt d'origine vagale. Pour autant, la signification fonctionnelle d'une innervation cholinergique dans la fonction de reproduction (depuis la conception jusqu'à la parturition) n'a jamais été comprise, alors que

l'acétylcholine par le biais de ses récepteurs muscariniques (mAChR) est un neuromédiateur puissamment contractile dans l'utérus, quelle que soit l'espèce.

2.1.b. Concept de l'innervation noradrénergique à "axone court"

En couplant la stimulation électrique des nerfs hypogastriques à l'utilisation d'un agent bloquant de la transmission ganglionnaire (hexaméthonium), Langley et Anderson (1895-96) ont très tôt montré qu'un important contingent de fibres préganglionnaires sympathiques faisait relais au-delà du GMI, dans les ganglions pelviens. Cependant, l'existence d'un relais ganglionnaire sympathique au contact de l'utérus a longtemps été contestée et il a fallu attendre l'utilisation des techniques d'histofluorescence des catécholamines dans les années 70 pour prouver son existence dans les ganglions pelviens. Ces neurones ont par la suite reçu le nom de neurones noradrénergiques « à axone court » du fait de leur étroite proximité avec les organes effecteurs, et pour les distinguer des neurones « à axone long » dont les corps cellulaires sont localisés plus en amont des tissus cibles, dans les ganglions prévertébraux ou ceux de la chaîne paravertébrale sympathique.

Chez l'animal, les neurones noradrénergiques « à axone court » ont longtemps été au centre d'une littérature dédiée à l'influence des hormones sexuelles sur le contrôle nerveux de la contractilité utérine. Ces neurones étaient considérés comme innervant essentiellement le muscle utérin (*i.e.* le myomètre) et non les vaisseaux (assuré par les « axones longs ») et l'une des particularités de l'utérus (en comparaison d'autres organes également innervés par le système nerveux sympathique) est la remarquable sensibilité des fibres noradrénergiques myométriales à l'environnement hormonal. Ainsi la densité de fibres et le contenu utérin en NA diminue considérablement en cours de gestation. Ces événements dépendent de la balance plasmatique oestro-progestative, comme en témoignent les expériences d'ovariectomie et de réimplantation de tissu ovarien, ou le traitement exogène par l'oestradiol ou la progestérone. Cette plasticité neuronale dynamique était initialement interprétée comme un effet sélectif des hormones sur le système de neurones noradrénergiques « à axone court » des ganglions pelviens. Elle a depuis été également observée à la puberté et au cours du cycle sexuel, tant au niveau de la densité des terminaisons nerveuses utérines que de la réceptivité myométriale (nature et densité des récepteurs adrénergiques, couplage des récepteurs aux protéines G), et est aujourd'hui considérée comme essentielle dans la compréhension du contrôle nerveux de la motricité génitale, tant au plan clinique (PMA, déclenchement à terme des contractions...) que zootechnique (insémination artificielle...).

2.2. Contribution à l'étude de l'innervation adrénergique et peptidergique du tractus génital chez la ratte [Thèse de Doctorat de l'Université Pierre & Marie Curie, Paris VI / Unité de Physiologie de la Reproduction (directeur, Pr. René Ozon) / Groupe « Neurophysiologie » dirigé par le Pr. Jean-Paul Rousseau]

2.2.a. Innervation noradrénergique des ovaires, de l'utérus et du cervix : une hétérogénéité dans l'origine et la distribution des terminaisons nerveuses

En combinant les études de marquage rétrograde des trajets d'axones, de la section de nerfs (hypogastriques, splanchniques et pelviens) et de la ganglionnectomie (ablation du GMI, des ganglions pelviens) (**Fig 6**) avec l'immunocytochimie des terminaisons nerveuses noradrénergiques dans les tissus cibles (marquage de l'enzyme tyrosine hydroxylase *ou* TH), nous avons identifié les voies nerveuses qui assuraient l'innervation sympathique du col de l'utérus (ou cervix), des cornes utérines, des oviductes et des ovaires chez la rate. Le principe reposait, d'une part, sur la dégénérescence rapide (1 semaine) des fibres nerveuses TH+ dans

un territoire tissulaire dont l'innervation était assurée par un contingent préalablement sectionné par voie chirurgicale, d'autre part, sur le traçage rétrograde des axones de neurones postganglionnaires dont les terminaisons nerveuses se projettent sur le territoire injecté au Fluorogold. S'il existait un consensus sur la contribution majeure des nerfs hypogastriques, du GMI et du GPC dans cette innervation, aucune étude n'avait permis de comparer la participation de chaque voie nerveuse et ganglions présents dans les cavités abdominale et pelvienne, ainsi que leur distribution étagée le long de l'appareil génital, et leur répartition entre les deux couches musculaires longitudinale et circulaire de l'utérus, chacune ayant une activité propre. Nos conclusions ont en particulier restreint le niveau de projections des neurones noradrénergiques « à axones courts » du GPC au seul territoire caudal de l'utérus, limitant de fait leur contrôle moteur à cette seule région de l'appareil génital. Ces études en neuroanatomie ont participé à la validation du modèle « rate » comme animal d'étude du contrôle nerveux de la motricité utérine abordé ensuite à l'INRA de Jouy-en-Josas. L'organisation somatotopique que nous proposons a concouru à réconcilier les différentes écoles sur l'origine et la distribution des fibres motrices sympathiques, en obtenant une vision plus générale et rigoureuse obtenue dans une seule espèce, le rat femelle, grâce à la combinaison de techniques dont certaines n'étaient pas disponibles quelques années seulement auparavant, en particulier les marqueurs rétrogrades.

Un premier travail focalisé sur le plexus pelvien a permis de définir des contours bien plus complexes de ce relais ganglionnaire chez la ratte, jusqu'alors considéré comme composé d'un ganglion *simplex*, le GPC. Nous avons montré que ce relais périphérique bilatéral était en fait accompagné de plusieurs ganglions accessoires, un premier groupe distribué en amont du GPC à l'extrémité du nerf hypogastrique le long de l'uretère distal, et un second situé en aval du GPC sur la paroi du vagin, chacune de ces structures ayant une contribution spécifique et étagée dans l'innervation de la région caudale de l'utérus (**Fig 7**). Par ailleurs, la population réelle de neurones sympathiques « à axone court » (*i.e.* TH+) dans l'ensemble du plexus pelvien chez la femelle n'excède finalement pas 10% de la population totale (**Fig 4B**), alors qu'elle était supposée atteindre jusqu'à 50% dans la littérature. Les autres neurones sont essentiellement cholinergiques (*i.e.* marqués pour l'enzyme acétylcholine transférase ou ChAT+), donc parasympathiques. De plus, une très faible proportion des neurones sympathiques « à axone court » se projette réellement à l'utérus, tant sur la musculature vasculaire et extravasculaire (myomètre) dans la région caudale de l'organe (la littérature précisait alors leur contribution exclusive à l'innervation extravasculaire et sur l'ensemble de l'utérus), et essentiellement dans la couche longitudinale du myomètre, en plus du cervix.

Figure 7 (extrait de Houdeau *et al*, J Auton Nerv Syst 1995)

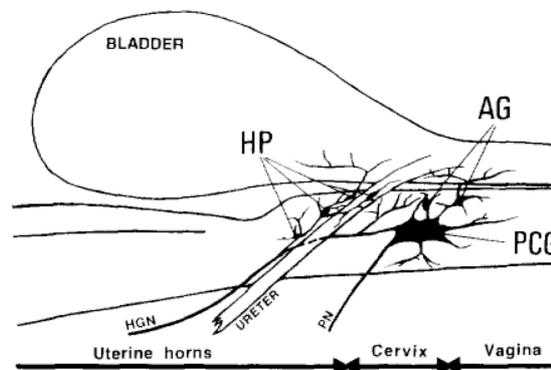


Fig. 1. Schematic drawing of the anatomical organization of the pelvic plexus. Sizes of the paracervical ganglion (PCG), accessory ganglia (AG) and ganglia of the hypogastric plexus (HP) are exaggerated in the scheme. HGN, hypogastric nerve; PN, pelvic nerve.

Dans une seconde étude sur l'origine et la distribution de l'innervation sympathique utérine, les conclusions ont confirmé la contribution très faible des ganglions pelviens à l'innervation noradrénergique de l'utérus, col compris, et évaluée à seulement 3% de l'innervation sympathique TH+ totale dans la région caudale, toutes origines confondues [*i.e.* ganglions de la chaîne paravertébrale sympathique lombaire (pour l'essentiel L2-L6 : 90%), ganglions supra-rénaux *ou* GSR (3%), GMI (3%)] (**Fig 8**). La partie haute des cornes utérines, des oviductes et des ovaires, est innervée essentiellement *via* deux trajets de nerfs ovariens (nerf supérieur ovarien *ou* NSO et plexus nerveux ovarien *ou* PNO) par les neurones postganglionaires de la chaîne paravertébrale thoraco-lombaire T10-L2 et des GSR, avec une participation faible des plexus coeliaques (ganglions aortico-rénaux *ou* ARG, et ganglion coeliaque *ou* GC). Il était important de constater une contribution essentielle des GSR à l'innervation de l'extrémité tubaire des cornes utérines (*i.e.* la zone d'aboutissement des oviductes), un site où l'innervation noradrénergique est de loin la plus riche de l'organe (responsable d'une activité musculaire supposée *pace-maker* au cours du cycle sexuel : Crane et Martin, 1991), et qui joue un rôle moteur essentiel en début de gestation dans la répartition équidistante des blastocystes le long des cornes utérines avant leur implantation (Legrand *et al*, 1987 et 1989). Ces GSR sont un relais ganglionnaire prévertébral du système nerveux sympathique, situés à l'extrémité des nerfs splanchniques majeurs, juste en amont des surrénales. Leur contribution à l'innervation de l'appareil génital femelle était jusqu'ici ignorée.

*Ces travaux ont été publiés dans
Journal of the Autonomic Nervous System (Houdeau et al, 1995),
Journal of Comparative Neurology (Houdeau et al, 1998)*

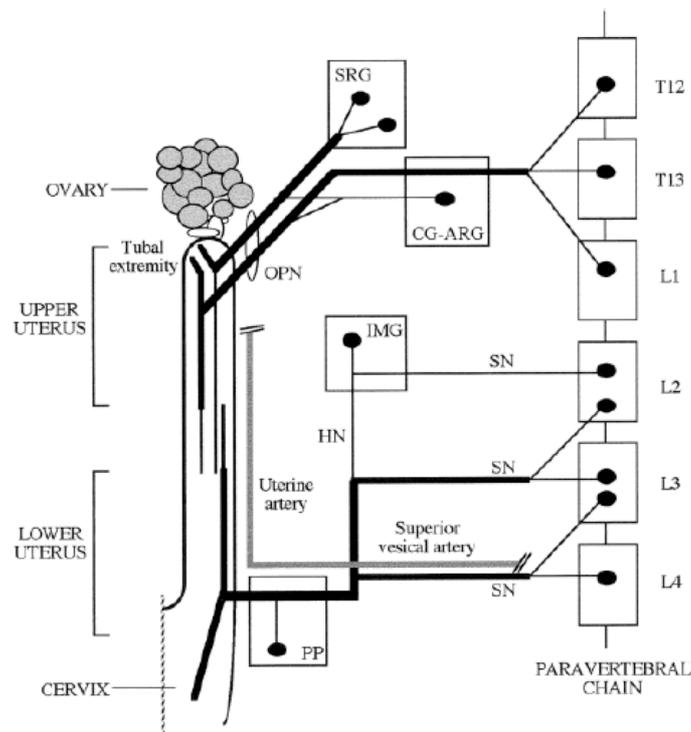


Fig. 7. Schematic representation of origins and routes of the sympathetic postganglionic nerve fibers of the uterus and cervix (left side of the genital tract). Thickness of the lines indicates the relative contribution of each source. Only major sources in the paravertebral chain are represented. Nerve fibers reaching the upper uterus arise from the ovarian plexus nerve (OPN) and mainly originate in the T12-L1 paravertebral ganglia and the suprarenal ganglia (SRG), with

the SRG mainly involved in the supply to the tubal extremity of the horns. Nerve projections to the lower uterus and cervix pass through the pelvic plexus (PP) and mainly originate in the L2-L4 paravertebral ganglia. The majority of these axons come from splanchnic nerves (SN) bypassing the inferior mesenteric ganglion (IMG) to directly connect with the hypogastric nerves (HN). CG-ARG, celiac ganglion and aorticorenal ganglia.

Figure 8 (extrait de Houdeau *et al*, J Comp Neurol, 1998)

2.2.b. Contribution du plexus pelvien dans l'innervation sympathique, parasymphatique et peptidergique du myomètre

Comme dit en introduction, le plexus ganglionnaire pelvien est une structure unique du système nerveux autonome, car composée d'une population mixte de neurones postganglionnaires noradrénergiques (*i.e.* sympathiques) et cholinergiques (*i.e.* parasymphatiques) (Fig 4B, C). En plus de leur neurotransmetteur principal, ces neurones coexpriment une ou plusieurs autres substances, souvent de nature peptidergique (NPY, VIP...) ou encore du monoxyde d'azote *ou* NO (nitric oxide). C'est le développement des techniques d'immunocytochimie dans les années 80 et les approches en double et triple-marquage sur de mêmes coupes de tissus qui ont permis une cartographie détaillée des systèmes d'expression de neurotransmetteurs/neuromodulateurs dans le système nerveux autonome (terminaisons nerveuses et corps cellulaires de neurones). Dans ce contexte, j'ai réalisé avec Marie Jeanne Prud'homme (CR1 INRA dans notre équipe) et Pierre Alain Boyer (en thèse 3^{ème} cycle, laboratoire A Calas) une étude de l'organisation des populations de neurones dans le GPC et ses ganglions annexes (l'ensemble constituant le plexus pelvien) en combinant les approches de l'immunocytochimie et de l'hybridation *in situ* (HIS).

Ces travaux nous ont permis plusieurs précisions, tant neuroanatomiques, avec une organisation somatotopique des neurones au sein même du plexus pelvien (c-à-d des populations neuronales très hiérarchisées géographiquement et regroupées par nature de neurotransmetteur principal et combinaison de substances), que fonctionnelles (ces différentes populations innervent des territoires spécifiques dans l'utérus et le col, avec un partage net entre les couches musculaires externe longitudinale et interne circulaire dans la paroi utérine). Ce qui intéressant avec les approches neuroanatomiques est la capacité de « signer » l'origine et la distribution des fibres nerveuses dans différents compartiments tissulaires d'un organe (vaisseaux, myomètre, endomètre, cervix, parties caudales et rostrales du tractus) sur la seule combinaison de substances observées. L'exemple de la colocalisation du neurotransmetteur primaire ACh avec le neuromodulateur VIP est le plus parlant : pour la musculature vasculaire et extravasculaire dans la région caudale de l'utérus, l'ACh est contractante alors que le VIP est relaxant (à la fois par des effets pré- et post-jonctionnels), ce qui sous-entend que ce dernier est modulateur de la réponse primaire à l'ACh (Stjernquist et Owman, 1987), suggérant une régulation « fine » de la puissance de la contraction utérine (e.g. péristaltisme « souple » associé à la remontée des gamètes *ou* contraction « puissante » nécessaire à l'expulsion des fœtus), tout en adaptant le lit vasculaire utérin à la situation. Le VIP étant par ailleurs absent des fibres nerveuses dans la partie rostrale de l'utérus (essentiellement NA+/NPY+), tout concourt à présenter ce peptide comme réservé exclusivement au contrôle moteur des vaisseaux et du myomètre de l'utérus « bas », et essentiellement dans la couche circulaire du myomètre.

*Ces travaux ont donné lieu à 3 articles publiés dans
Cell and Tissue Research (Houdeau et Boyer, 1994 ; Houdeau et al, 1997),
Histochemical Journal (Houdeau et al, 1998)*

2.2.c. Les cellules SIF : une « glande endocrine » dans les ganglions nerveux pelviens

Les cellules SIF doivent leur appellation à leur nature catécholaminergique, pour la première fois identifiée par la technique de fluorescence *in situ* des catécholamines (SIF : small intensely-fluorescent cells), et sont semblables aux cellules chromaffines des glandes surrénales. Comme pour les corps cellulaires de neurones, plusieurs classes de cellules SIF ont été identifiées sur la base de combinaison de neuropeptides comme le VIP, la somatostatine, la dynorphine, la galanine ou encore le NPY, colocalisés avec le transmetteur

principal, souvent la noradrénaline (Morris et Gibbins, 1987 ; Papka *et al*, 1987 ; Chiba et Masuko, 1989). Essentiellement étudiées dans les ganglions du système nerveux sympathique, les cellules SIF sont considérées comme des *paraneurones*, une classe d'interneurones présentant des propriétés sécrétrices paracrines participant au contrôle de la transmission ganglionnaire synaptique et modifiant l'activité des neurones principaux. Le GPC est en ce sens un modèle d'étude intéressant, tant par une population très riche en cellules SIF (isolées avec des prolongements de neurites *ou* plus souvent en amas [clusters] étroitement associés à des capillaires fenestrés), que par la présence d'une population mixte de corps cellulaires de neurones, sympathiques et parasympathiques.

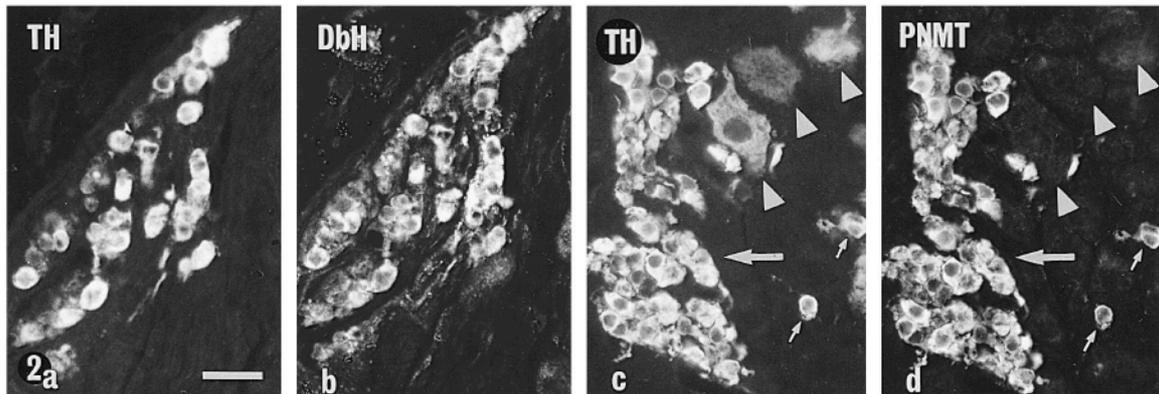


Fig. 2. Double-labelling immunofluorescence for catecholamine-synthesizing enzymes in single sections of a control PCG. Immunolabelling for TH is observed in a cluster of SIF cells (a) and is colocalized with DbH (b). (c) Immunolabelling for TH is observed in clustered (large arrow) and solitary (small arrows) SIF cells; additional TH-immunostaining is also found in some cell bodies of neurons (arrowheads). (d) Same section showing that PNMT-immunostaining is present in all TH-IR SIF cells but absent in TH-IR neurons. Scale bar = 30 μ m.

Figure 9 (extrait de Prud'homme, Houdeau *et al*, Brain Res, 1999)

On sait aujourd'hui que les cellules SIF sont issues de la crête neurale, comme les neurones sympathiques et les cellules chromaffines, et se développent depuis les cellules de la lignée sympatho-adrénale (Huber, 2006). En d'autres termes, les cellules SIF sont issues des mêmes cellules progénétrices que les neurones, mais ne se sont pas spécialisées jusqu'à ce stade, adoptant *in fine* des propriétés sécrétrices intraganglionnaires. Nous avons montré que les cellules SIF du GPC présentent tout l'équipement enzymatique permettant la synthèse d'adrénaline, et libèrent ce médiateur dans le ganglion (**Fig 9**). Elles expriment de plus des récepteurs muscariniques, suggérant que leur activité de sécrétion est modulée par l'ACh. En réalisant une déafférentation chirurgicale du GPC (*i.e.* sections des nerfs hypogastrique et pelvien), il est apparu que ces cellules étaient innervées par des prolongements d'axones des neurones postganglionnaires parasympathiques du GPC lui-même (**Fig 10**). Ainsi les cellules SIF du GPC sont organisées en amas de cellules endocrines, où l'adrénaline est sécrétée *in situ*, sous le contrôle (au moins partiel) des neurones postganglionnaires cholinergiques voisins.

Cette étude a été publiée dans Brain Research (Prud'homme, Houdeau et al, 1999)

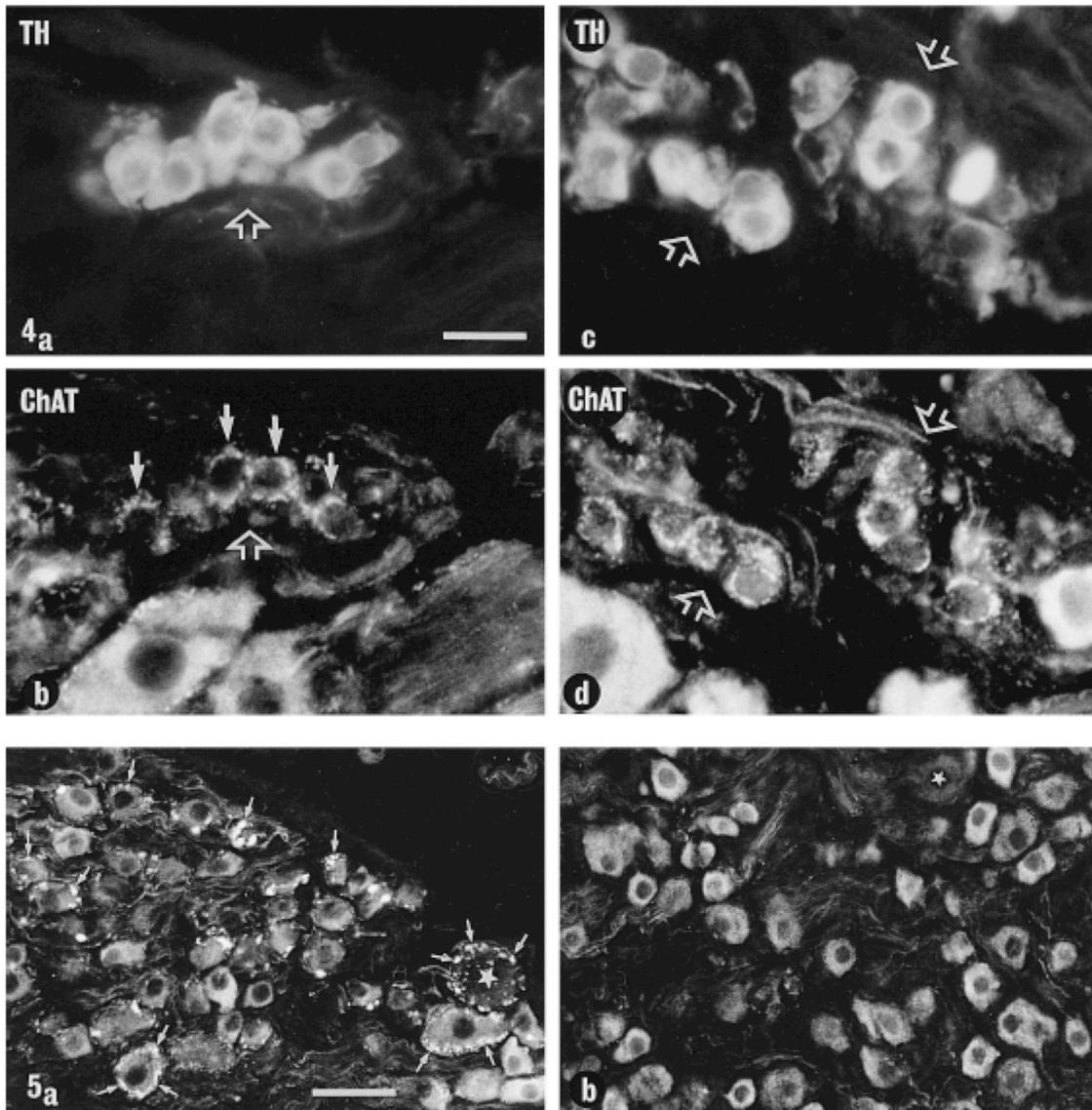


Fig. 4. Double-labelling immunofluorescence for TH (a, c) and ChAT (b, d) in single sections of a control PCG (a, b) and after ganglion deafferentation (c, d). (a, b) In the control PCG, TH-IR SIF cells (empty arrows) are surrounded by varicose ChAT-IR nerve fibres (full arrows in b). (c, d) ChAT-IR nerve varicosities associated with TH-IR SIF cells (empty arrows) are not altered by the deafferentation. Scale bar = 20 μ m.

Fig. 5. Immunofluorescence for ChAT on PCG sections of a control ganglion (a) and after ganglion deafferentation (b). (a) Numerous cell bodies of postganglionic neurones are immunostained for ChAT and are surrounded by ChAT-IR varicosities (arrows); note the presence of a cell body negative for ChAT (star) also surrounded by ChAT-IR varicosities (arrows). (b) Following deafferentation, ChAT-IR varicosities disappeared around negative (star) and ChAT-IR neurones. Scale bar = 50 μ m.

Figure 10 (extrait de Prud'homme, Houdeau *et al*, Brain Res, 1999)

2.3. Intégration du signal nerveux autonome et motricité utérine [INRA, Centre de Jouy-en-Josas, 1997(recrutement CR2)-2003 / Unité de Neurobiologie des Fonctions Végétatives, dirigée par JP Rousseau, puis O Rampin]

Le rôle fondamental de l'innervation dans l'utérus, en particulier son contrôle moteur, a souvent été décrié. A ces détracteurs une observation simple, celle qu' « une femme tétraplégique est fertile avec une grossesse arrivant normalement à son terme ». Dans un tel contexte, nombre de cliniciens considèrent que le contrôle nerveux autonome de l'activité musculaire utérine n'est pas essentiel à la physiologie du travail (ou seule la perception des contractions peut être altérée selon le niveau de lésion médullaire). Les spécialistes de la PMA (insémination artificielle et transfert d'embryon) insistent cependant sur l'importance de

la fréquence des contractions et leur direction (ascendantes et descendantes) dans la rencontre des gamètes, puis la nidation (Kunz *et al*, 1996 ; Fanchin *et al*, 2001, 2002). A l'INRA dans les filières zootechniques, le problème se pose dans le même sens, à savoir que les inséminateurs n'ont jamais tenu compte de l'importance de la contractilité utérine dans le résultat des fertilités (activité réflexe lors de la stimulation des voies génitales, influence du traitement hormonal, du stress de contention...), alors que le succès de l'IA et du TE dans les élevages reste insuffisant quelle que soit l'espèce, et décroît ces dernières années, sans que l'on en connaisse véritablement les raisons.

J'ai développé à Jouy-en-Josas des approches de pharmacologie *in vivo* et *in vitro* permettant d'apprécier la qualité des réponses myométriales aux neuromédiateurs (très changeantes selon le statut hormonal et l'espèce) et l'influence de stimuli externes (physiques et environnementaux) sur la motricité utérine (accouplement *versus* IA). La rate et la souris ont été utilisées comme modèles de référence en laboratoire, la brebis et la chevrette comme espèces d'intérêt agronomique. La méthode d'enregistrement téléométrique de l'activité utérine chez l'animal éveillé a d'abord été mise au point chez la ratte avant d'être transposée à la brebis. C'est dans le cadre de ces études que j'ai encadré deux étudiants en DEA (Emmanuel Barranger et Pierre Raynal, internes de Gynécologie-Obstétrique) ayant chacun contribué au développement de ces outils.

2.3.a. Rôle fonctionnel de l'innervation cholinergique au cours du cycle sexuel chez la rate : influence du statut stéroïdien et voies réflexes de libération d'acétylcholine

Chez la rate cyclique, les contractions utérines induites *in vitro* par la stimulation en champ électrique sont ACh-dépendantes, car essentiellement abolies par l'atropine (un antagoniste muscarinique). Ces réponses sont maximales en oestrus, puis disparaissent en phase lutéale, témoignant d'une influence marquée de l'environnement stéroïdien (Fig 11). Comme attendu, les contractions cholinergiques évoquées ne s'observent que dans les régions présentant l'innervation parasympathique la plus dense : le cervix et la partie caudale des cornes utérines, et majoritairement la couche circulaire du myomètre. Il est ici important de souligner que le facteur limitant dans ces effets est bien la présence de fibres nerveuses cholinergiques en densité suffisante dans le tissu. En effet, la sensibilité muscarinique des cellules musculaires lisses (évaluée *in vitro* par l'évaluation 'dose-réponse' au carbachol, un agoniste des récepteurs muscariniques) est présente sur l'ensemble de l'utérus en oestrus, quelle que soit la couche musculaire ou la région. L'absence d'effet en phase lutéale sous la dominance de la progestérone procède d'une désensibilisation utérine pour l'ACh, non d'une diminution de la densité en fibres nerveuses, stable tout au long du cycle sexuel (Fig 12).

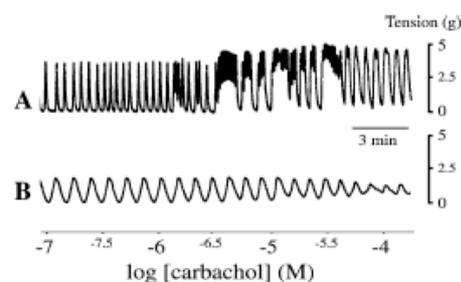


Fig. 5. Representative recordings of uterine contractile activity in response to cumulative doses of carbachol in cyclic rat. (A) In oestrus, carbachol added every 3 min to the organ bath increased both frequency and amplitude of uterine tension in a dose-dependent manner. (B) In diestrus, the presence of carbachol caused a weak increase of uterine tension at high concentrations (>10 μ M).

Figure 12 (extrait de Houdeau *et al*, Auton Neurosci, 2003)

Ces résultats nous ont alerté sur l'importance de l'innervation cholinergique sous imprégnation oestrogénique, plus précisément la période périovulatoire et à terme de gestation, deux situations où les contractions utérines participent respectivement à la remontée des gamètes mâles pour la fécondation et à la physiologie du travail. Dans l'organisation de l'arc réflexe de l'innervation utérine, l'information sensitive est intégrée via les fibres afférentes dans les centres nerveux moteurs. Cette information permet l'activation ou l'inhibition des voies préganglionnaires d'origine spinale pour adapter la motricité utérine en réponse à l'accouplement, aux gestes de l'IA, ou à la compression puis l'ouverture du col au moment de la mise-bas. En particulier les afférences des nerfs pelviens sont essentielles à la parturition : leur section avant terme empêche la mise-bas chez la ratte.

Dans le cadre du stage DEA de Emmanuel Barranger (1998/99), nous avons mis en évidence une connexion entre les fibres afférentes de la partie caudale de l'utérus incluant le col (majoritairement véhiculées par les nerfs pelviens) et les neurones postganglionnaires cholinergiques projetant sur cette même région. Ces connexions s'établissent par voie de collatérales d'axones dans les ganglions pelviens et contiennent le CGRP, un neuropeptide connu pour réguler la transmission ganglionnaire (**Fig 13**). Cette innervation CGRP+ des neurones cholinergiques a pour origine les ganglions des racines dorsales de la moelle (ganglions rachidiens L6-S1). Un tel réseau démontre un niveau d'intégration supplémentaire du message sensitif (en plus des projections centrales sur la moelle lombo-sacrée), suggérant une adaptation réflexe rapide de l'innervation parasympathique (dès le premier niveau ganglionnaire au contact de l'organe effecteur) en réponse aux stimulations périphériques. A ce stade des travaux, la question de la mise en jeu « réflexe » de l'innervation utérine s'est imposée dans les études ultérieures.

*Ces travaux ont donné lieu à 2 articles publiés dans **Neuroscience Letters** (Houdeau et al, 2002), **Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical** (Houdeau et al, 2003)*

2.3.b. Innervation autonome et insémination artificielle dans les élevages: importance du geste d'insémination dans les résultats de fertilité

Les particularités anatomiques du cervix chez la brebis imposent que la semence soit déposée à l'entrée du col (IA cervicale). Or les taux de gestation observés dans ces conditions restent inférieurs aux rendements de fertilité après accouplement, ou après insémination intra-utérine sous contrôle endoscopique. Outre les questions de conservation des gamètes mâles, des modifications de motricité utérine au moment de l'IA par les voies naturelles peuvent expliquer une part de ces échecs. La stimulation réflexe des voies génitales peut générer un environnement contractile, incompatible avec la notion de réservoir utérin nécessaire au maintien du pouvoir fécondant des spermatozoïdes.

Au cours du stage DEA de Pierre Raynal (1999/00), nous avons reproduit et décomposé les gestes de l'insémineur chez des brebis équipées d'un capteur télémétrique de pression intra-utérine (**Fig 14**). Dans la situation où l'opérateur cherche l'entrée du col à l'aide du spéculum avant d'introduire la sonde d'insémination, les stimulations répétées du vagin génèrent une motricité tonique perdurant bien au-delà du retrait du spéculum (jusqu'à 20 min) (**Fig 14C**). Au contraire, lorsque le spéculum est introduit sans pression excessive sur les parois vaginales, l'utérus retourne rapidement à son activité de base après l'IA (**Fig 14B**). Dans tous les cas, une contraction de courte durée (<20 s) est provoquée par la seule introduction du spéculum, tandis qu'une seconde contraction apparaît à l'ouverture des valves (**Fig 14B**). La première réponse est due à la libération réflexe de NA dans le myomètre (bloquée par la phentolamine, un antagoniste α -adrénergique global) (**Fig 15A**), tandis que la seconde implique les fibres nerveuses cholinergiques (bloquée par l'atropine) (**Fig 15B**) qui

n'existe pas dans les conditions naturelles de l'accouplement (**Fig 16**). En effet, seul les fibres noradrénergiques du système nerveux sympathique sont activées à l'intromission pénienne et provoquent une contraction unique de l'utérus, bloquée par la phentolamine, avant de retourner à son activité spontanée (**Fig 16**).

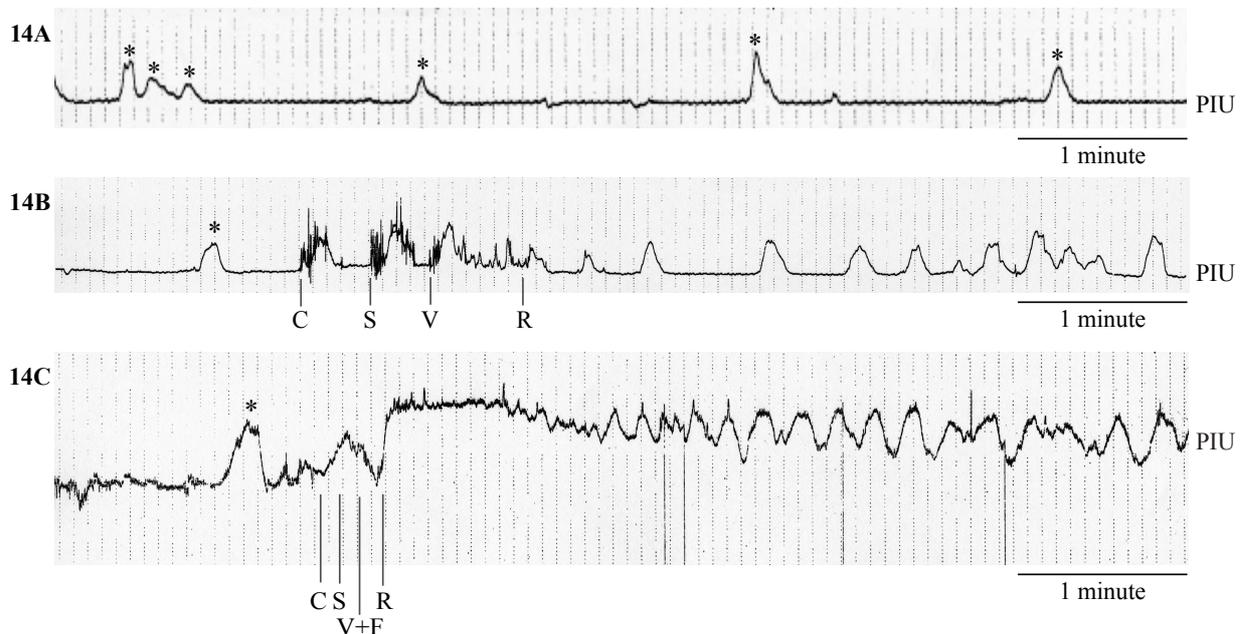


Figure 14 Décomposition du geste de l'IA. Variation de pression intra-utérine (PIU)

14A : activité utérine spontanée au cours de l'oestrus.

14B : contraction utérine unique en réponse à la contention de la brebis (C), à l'introduction du spéculum (S) et l'ouverture des valves (V).

14C : l'ouverture des valves avec fouille vaginale (V+F) est associée à une hyperactivité utérine retardée.

R : retrait du spéculum. * : contraction utérine spontanée.

(extrait de Raynal et Houdeau, J Gynecol Obstet Biol reprod (Paris) 2004)

Par ailleurs, en réponse à une stimulation trop appuyée des voies génitales, nous avons montré que la motricité tonique de l'utérus procède d'un réflexe neuroendocrinien de libération d'OT depuis l'hypophyse (réflexe « de Ferguson ») (**Figs 14C et 15D**). Elle est en effet mimée par l'injection i.v. de Syntocinon®, une OT de synthèse. De plus en élevage, dans les conditions d'une IA de routine, nous avons montré une augmentation significative des taux plasmatiques d'OT, lorsque l'accès au col a été jugé difficile par l'inséminateur. Une telle sécrétion n'est pas déclenchée lors de l'accouplement chez la brebis (**Fig 16**). Nous avons fait l'hypothèse que l'action utéro-contractante de l'OT, très puissante sous l'influence des oestrogènes circulants, était probablement délétère au transit correct des gamètes vers le site de fécondation.

Chez les petits ruminants d'élevage, des conditions difficiles de dépôt de semence en IA se rencontrent souvent chez les nulli- et primipares, du fait de la faible distensibilité vaginale en l'absence de mise-bas, ou après une seule gestation. A la demande de collègues INRA (Bernard Leboeuf, SEIA, Rouillé), nous avons étudié sur plusieurs saisons les effets de la

durée du geste d'insémination sur le taux de fertilité chez la chevrette (inférieur et très variable en comparaison de l'adulte). Les résultats sont en faveur de notre hypothèse, avec un gain de 16 points de fertilité lorsque la semence est déposée rapidement à l'entrée du col, évitant ainsi la stimulation excessive des voies génitales (donc de la contractilité utérine), à l'inverse d'un dépôt plus long, intracervical, nécessitant de passer les anneaux du col (**Fig 17**). Sur l'effectif 2001-2004 (325 individus), une analyse statistique souligne un effet « durée » très significatif ($p=0.003$), sans interaction avec les effets « éleveur » ou « année », autres paramètres influant le taux de fertilité des animaux.

*Ces travaux sont à l'origine de 3 articles publiés dans **Reproduction, Nutrition, Development** (Houdeau et al, 2002), **Journal de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la Reproduction (Paris)** (Raynal et Houdeau, 2004), **Animal** (Houdeau et al, 2008)*

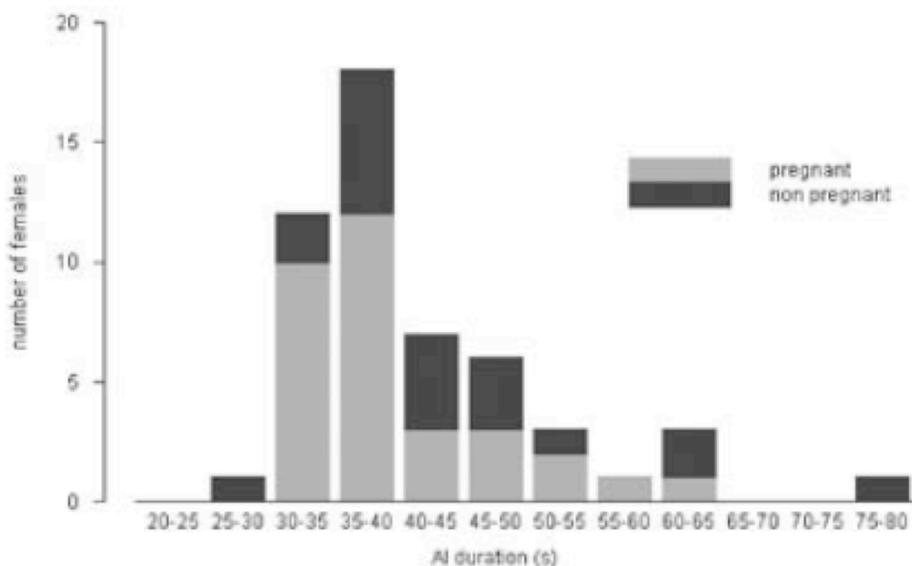


Figure 17 Relation durée d'insémination – gestation chez la chevrette nullipare

2.4. Régulation du système Phospholipase C myométrial au cours de la gestation [INRA, Centre de Jouy-en-Josas, 2000-03 / Unité de Neurobiologie des Fonctions Végétatives]

Les travaux sur la gestation trouvent leur intérêt dans la compréhension des mécanismes nécessaires au maintien d'un utérus quiescent propice au bon développement des fœtus. Dans ce sens, l'étude la voie de signalisation par la phospholipase C β (PLC β) est intéressante, car couplée à la contraction utérine lorsqu'elle est stimulée par les récepteurs $\alpha 1$ -adrénergiques, les récepteurs muscariniques (ACh) ou encore les récepteurs à l'OT.

En collaboration avec Sakina Mhaouty-Kodja, nous avons apporté une preuve fonctionnelle à mi-gestation (études *in vitro* sur lambeaux d'utérus) de l'existence d'un mécanisme β -adrénergique de relaxation indépendant de la voie AMPc classique⁴. Cette

⁴ L'AMPc est le produit de la stimulation de l'adénylate cyclase, enzyme membranaire couplée aux récepteurs β -adrénergiques *via* les protéines G α s. Il joue un rôle pivot dans le relâchement musculaire (inhibition de la MLCK) permettant la quiescence utérine (*e.g.* utilisation clinique de β -mimétiques dans le traitement de la menace d'accouchement prématuré).

activation entraîne une hyperpolarisation membranaire et par conséquent la fermeture de canaux calciques voltage dépendants. En diminuant les concentrations intracellulaires de Ca^{2+} , les récepteurs β -adrénergiques atténuent probablement l'activité des PLC β (enzymes sensibles au calcium). Ainsi, dans le muscle longitudinal où les fibres nerveuses sympathiques et les récepteurs β -adrénergiques prédominent, la NA exerce une régulation négative sur le système PLC au cours de la gestation, en plus de son action relaxante « directe » *via* la voie adénylate cyclase et la production d'AMPc. Cette régulation β -adrénergique du système PLC est suffisamment puissante pour inhiber l'activité spontanée du myomètre, puis diminuer la réponse à l'OT et à l'ACh. En affaiblissant ainsi la réponse aux agents contractants, la NA libérée par les fibres nerveuses sympathiques pourraient participer à la protection des unités foeto-placentaires contre une stimulation de l'activité utérine pendant la gestation, synonyme en clinique de fausse-couches ou, plus tard, de naissances prématurées.

Concernant cette fois les récepteurs α 1-adrénergiques, cette famille de récepteurs est impliquée dans la reprise des contractions à terme de gestation (hormis chez la souris, *cf* Mhaouty-Kodja, Houdeau *et al*, 2001). Tout comme les récepteurs de l'ACh ou de l'OT, les récepteurs α 1 sont couplés à la voie de dégradation (hydrolyse) des phosphoinositides en inositol phosphate (IP_3) par les PLC β , aboutissant à la libération de Ca^{2+} à partir des stocks intracellulaires, promoteur de la contraction. Ma contribution a été d'apporter des preuves fonctionnelles de régulation par les stéroïdes sexuels de ces différentes voies de contractions de l'utérus dans les muscles longitudinal et circulaire au cours de la gestation. Dans le muscle utérin circulaire, la contraction induite par l'OT est faible au cours de la gestation et augmente de manière importante à terme. La diminution significative de l'EC50 et l'élévation du E_{max} témoignent de cette amélioration de la réponse aux facteurs contractants à terme. Ceci est probablement dû à la régulation directe des différentes entités de transduction (récepteur, protéine G, PLC β) par les hormones stéroïdes puisqu'en réponse à l'OT la production d' IP_3 libérant le Ca^{2+} intracellulaire s'améliore également à terme. En effet, la caractérisation de ces différentes protéines de transduction dans le myomètre de ratte gravide a révélé que la quantité de la protéine Gq α et des PLC β 1 et PLC β 3 est très faible au cours de la gestation et augmente de manière importante au moment du terme. De plus, l'injection d'oestradiol aux rattes au cours de la gestation augmente significativement la quantité de la protéine Gq α et des PLC β 1 et PLC β 3 alors que l'administration de progestérone en fin de gestation diminue le niveau d'expression de la protéine Gq α et reste sans effet sur les PLC β 1 et PLC β 3.

En conclusion, il apparaît donc qu'au cours de la gestation la progestérone exerce un effet relaxant indirect dans le muscle longitudinal *via* l'up-régulation de la voie de signalisation β -adrénergique et inhibe directement l'expression de protéines associées à la contraction (récepteurs OT, Gq α , PLC β 1, PLC β 3) dans le muscle circulaire. A l'approche du terme, l'effondrement des concentrations de progestérone entraîne la désensibilisation du maillon β -adrénergique, levant ainsi le frein inhibiteur exercé sur le système PLC dans le muscle longitudinal. Dans le muscle circulaire, l'élévation concomitante des concentrations d'oestradiol permet d'induire l'expression des gènes cibles.

*L'ensemble de ces travaux a donné lieu à 4 publications dans **The Journal of Physiology-London** (Mhaouty-Kodja, Houdeau et al, 2001), **Biology of Reproduction** (Mhaouty-Kodja, Houdeau et al, 2004), **Journal of Endocrinology** (Houdeau et al, 2005), **Reproduction** (Dupuis, Houdeau et al, 2008)*

2.5. Conclusions des travaux sur la période « tractus génital »

En réalisant une cartographie de l'innervation utérine, neuroanatomique et fonctionnelle, j'ai participé à la caractérisation de la réactivité myométriale à la NA et l'ACh, en tenant compte d'une distribution étagée le long de l'utérus, d'une régionalisation poussée entre les deux musculatures de l'organe et de l'influence de l'environnement stéroïdien. Si une littérature abondante en pharmacologie sur lambeaux d'organes avaient préalablement décrit les effets spécifiques de chacun de ces médiateurs principaux - en présence ou non d'autres agents modulateurs de ces réponses princeps (*e.g.* neuropeptides, NO) - aucune étude ne s'était penchée sur la question d'une régionalisation de leurs effets et la versatilité d'action selon l'imprégnation hormonale au cours du cycle sexuel et pendant la gestation. Depuis cette période, de nombreux travaux se sont penchés sur la distribution des récepteurs aux oestrogènes dans les corps cellulaires des neurones innervant l'utérus (*revues dans* Papka et Mowa, 2003 ; Keast, 2006), ou encore la réduction oestrogéno-dépendante de la densité des fibres noradrénergiques dans le myomètre (*revues dans* Latini *et al*, 2008 ; Brauer, 2008). Il est maintenant bien établi que la densité des terminaisons nerveuses dans chaque musculature, la sensibilité myométriale aux hormones sexuelles et aux effets induits par la NA et l'ACh (en plus de l'OT) sont parmi les principaux éléments qui concourent au passage d'un état de relaxation utérine, caractéristique de la gestation et nécessaire au développement des unités foeto-placentaires, à un état contractile à l'approche du terme et nécessaire au « travail ». D'autres travaux se sont également penchés sur l'importance de l'étagement des voies extrinsèques d'innervation (nerfs pelviens, hypogastriques, origine spinale...) dans le contrôle tonique du col de l'utérus avant terme et à terme (Boyd *et al*, 2009 ; Kirby *et al*, 2010). Aujourd'hui la plupart des travaux portant sur l'innervation de la sphère génitale s'attachent à comprendre les états de douleur pelvienne récurrente (*revue dans* Berkley, 2005), souvent associés au *remodeling* de l'innervation génitale, par exemple chez les femmes souffrant d'endométrieose (Al-Jefout *et al*, 2009). Enfin, la naissance prématurée (*i.e.* survenant avant 37 semaines de grossesse) reste toujours un grand problème de santé publique et fait régulièrement appel aux recherches sur la contractilité utérine en réponse aux hormones et médiateurs, possiblement responsable d'une réactivité anormale du myomètre et l'effacement précoce du col (*revue dans* Mitchell et Taggart, 2009).

Dans les filières d'élevage, nos résultats ont également permis, pour la première fois, de corrélérer la qualité des gestes associés aux techniques d'insémination à l'état de contractilité utérine et les résultats de fertilité. Cette partie du travail a été particulièrement enrichissante dans la transposition de connaissances fondamentales à la réalité du terrain, où l'utérus est trop souvent considéré comme un « réservoir » où déposer la semence sans appréhender les conséquences des stimulations mécaniques appliquées sur les voies génitales (Leboeuf *et al*, 2008). Ces mêmes questions de dynamique utérine se posent toujours en PMA chez la femme, où le déclenchement de contractions après un TE conduit souvent à l'expulsion immédiate ou retardée de l'embryon, un des principaux facteurs limitant le succès de l'implantation et une grossesse viable (Fanchin et Ayoubi, 2009). Une meilleure connaissance des voies réflexes sollicitées dans ces techniques, au même titre que nos observations chez le rat et le petit ruminant, ouvre de nouvelles perspectives pharmacologiques dans la maîtrise de la contractilité utérine au moment du transfert d'un ou plusieurs embryons par les voies naturelles (*exemple dans* Pierzynski *et al*, 2007).

CYTOKINES et HORMONES SEXUELLES :
*un support aux interactions viscéro-viscérales
entre appareil génital et barrière intestinale*

3.1. Statut hormonal et tractus gastrointestinal : introduction aux travaux de recherche

Les axes de recherches développés dans l'Unité de Neuro-Gastroentérologie et Nutrition (NGN, UMR 1054) s'inscrivent principalement dans le Champs Thématique 2 du Département Alim H (relations entre contenu digestif et paroi intestinale), avec une orientation en « Sécurité sanitaire des aliments » dans l'évaluation des effets d'agents toxiques d'origine chimique, contaminants de la chaîne alimentaire. Outre les aspects fondamentaux (inflammation, barrière intestinale, stress et douleur viscérale), les travaux dans l'unité s'appuient sur des données "cliniques" pour l'évaluation de l'importance de la barrière intestinale dans le développement de troubles fonctionnels digestifs (syndrome de l'intestin irritable ou SII) et inflammatoires (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou MICI).

J'ai rejoint l'unité NGN alors dirigée par Jean Fioramonti en septembre 2003. Pour bénéficier de mes compétences précédentes (neurosciences, endocrinologie, biologie de la reproduction), mon intérêt s'est dans un premier temps dirigé sur les altérations fonctionnelles de l'appareil génital femelle associées aux pathologies intestinales. Cette thématique reposait sur la notion d'interactions viscéro-viscérales susceptibles d'altérer le confort pelvien (douleurs abdominales) et la fonction de reproduction (fertilité) lors d'une réaction inflammatoire dans le tube digestif, qu'elle soit chronique ou aiguë. Dans un second temps, des récepteurs aux stéroïdes sexuels étant exprimés dans différents compartiments cellulaires de l'intestin, mes recherches se sont tournées vers l'influence du statut hormonal sur la physiopathologie du tube digestif. Cette deuxième voie de recherches était motivée par le constat d'un dimorphisme sexuel dans la perception de la douleur viscérale, de symptômes gastro-intestinaux influencés par le statut hormonal chez les patientes atteintes de MICI ou de SII, d'une incidence sur le confort digestif (constipation péri-menstruelle).

Au fur et à mesure de l'avancée de ces études, l'articulation avec des projets menés par mes collègues est apparue évidente, tout particulièrement dans l'évaluation de la balance risque/bénéfice pour l'organisme d'agents présentant des propriétés hormono-mimétiques, qu'ils soient d'origine chimique (perturbateurs endocriniens entrant dans la composition de plastifiants au contact des aliments) ou nutriments à bénéfice « santé » (phytoestrogènes des compléments alimentaires à base de soja). En particulier, la démonstration du *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) comme cytokine « cible » des stéroïdes sexuels dans la paroi intestinale (épithélium, neurones entériques et macrophages) a rapidement été exploitée comme témoin sensible à ces produits, dès les faibles doses d'exposition. Nous avons depuis développé un panel d'outils et de techniques pour apprécier l'influence des stéroïdes sexuels (cycle sexuel ou supplémentation chez l'animal castré) ou de xénoestrogènes apportés par l'alimentation (phtalates, bisphénol A (BPA)) sur différentes composantes de la barrière intestinale (perméabilité paracellulaire et composante immunitaire), dans les conditions basales (animal normal) ou celles d'une pathologie (colite expérimentale), chez l'adulte ou en période périnatale.

La période périnatale s'est aujourd'hui avérée cruciale à étudier, après que nous ayons montré qu'un perturbateur endocrinien comme le BPA présentait toutes les caractéristiques oestrogéno-mimétiques pour affecter la maturation de la fonction de barrière intestinale. Cette fonction se met naturellement en place dès les derniers temps fœtaux (différentiation des

muqueuses intestinales), puis chez le nouveau-né au fur et à mesure de la colonisation bactérienne de son intestin, quasi stérile à la naissance (maturation du système immunitaire et tolérance bactérienne) et des transitions alimentaires (allaitement et/ou lait maternisé, puis aliments solides et liquides de plus en plus variés). Les oestrogènes naturels participent activement à la maturation périnatale de l'intestin (développement de l'épithélium, contrôle de la perméabilité et de la réponse immunitaire innée), selon une séquence chronologique que le BPA, même ingéré par la mère à de faibles doses, se montre capable de perturber. Cette conception d'une altération précoce des fonctions endocrines, au niveau de l'organe cible en développement, est de loin le paradigme le plus étudié aujourd'hui dans le domaine des perturbateurs endocriniens, et est au cœur de la notion de *l'origine précoce des maladies de l'adulte*.

3.1.a. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et troubles de la fertilité : données cliniques

Les MICI regroupent plusieurs maladies chroniques de l'intestin, incluant principalement la maladie de Crohn et la rectocolique hémorragique (RCH), deux pathologies caractérisées par des phases d'activité alternant avec des périodes de rémission. Ces deux maladies inflammatoires sont souvent observées chez des patients jeunes, en âge de reproduction. Si l'effet des hormones et des variations hormonales cycliques chez la femme a souvent été débattu sur des observations de prévalence et de symptomatologie (voir §3.1.b), l'influence même de la maladie sur la fertilité des patients, homme ou femme, le cycle menstruel ou encore la grossesse reste moins documentée.

Le pic d'apparition des MICI correspond donc aux années de fertilité, sans prévalence marquée pour l'un ou l'autre des deux sexes (Reddy et Wolf, 2001). Les conséquences sur la qualité de vie et la fertilité seront toutefois différentes selon le sexe des patients, en particulier pour la femme où les périodes d'activité de la maladie sont souvent associées à des anomalies gynécologiques, telles que l'aménorrhée (absence de règles), oligoménorrhées (règles peu abondantes) et dysménorrhées (règles douloureuses car associées à des crampes utérines) (Alstead, 2002 ; Kane, 2003 ; Bradley et Rosen, 2004). Malgré des complications possibles de la maladie en cours de grossesse (*i.e.* reprise d'activité inflammatoire), il existe un consensus pour dire que la majorité des patientes RCH ayant souhaité avoir un enfant ont eu une grossesse normale et leur nouveau-né à terme (Reddy et Wolf, 2001). La faible fertilité apparente en statistique par rapport aux sujets sains relèverait plutôt de la réticence des patientes à procréer, conséquences de l'inconfort permanent et de leurs inquiétudes sur des effets potentiellement tératogènes des médicaments, ou encore des complications liées à la maladie (craintes de fausse couche ou de prématurité). Cependant, d'autres études cliniques concourent à dire que la fertilité chez les patientes souffrant cette fois de Crohn est diminuée en relation avec l'activité de la maladie et le degré d'inflammation, suggérant une relation de cause à effet dans cette pathologie. Pour exemple, chez l'animal, des troubles de la stéroïdogenèse et de la cyclicité ovarienne ont aussi été montrés dans des modèles d'inflammation systémique chez le primate et la brebis (Xiao *et al*, 1998, 1999 ; Karsch et Battaglia, 2002).

Enfin, la puberté retardée est une manifestation extraintestinale fréquente lorsque la maladie de Crohn se développe pendant l'enfance, chez le garçon comme la jeune fille (Brain et Savage, 1994 ; Wong *et al*, 2006). Chez le rat, des retards de puberté ont également été relevés pendant une colite expérimentale, accompagnés de faibles niveaux de testostérone chez le mâle et d'une cyclicité ovarienne anormale chez la femelle (Azooz *et al*, 2001).

3.1.b. MICI et Syndrome de l'Intestin Irritable (SII): prévalence liée au sexe et influence du statut hormonal

Comme dit plus haut, parmi les patients souffrant de MICI, les cliniciens s'accordent à dire qu'autant de femmes que d'hommes souffrent de RCH ou de la maladie de Crohn. Il n'en est pas de même pour le SII, un trouble fonctionnel digestif à forte prévalence caractérisé par des douleurs abdominales, des ballonnements, une constipation (SII-C), des diarrhées (SII-D), voire ces deux derniers symptômes en alternance (SII-A).

Des études épidémiologiques ont conclu à une plus forte prévalence du SII chez la femme (Mayer *et al*, 1999; Heitkemper *et al*, 2008), un résultat toutefois variable selon les critères de diagnostique (Rome I à III). Comme pour les MICI, la plupart des patientes souffrant de SII sont dans leurs années de fertilité, avec une influence marquée de leur statut hormonal sur la sévérité des symptômes, en particulier la douleur viscérale (Heitkemper *et al*, 2003 ; Altman *et al*, 2006 ; Whitehead *et al*, 1990). En effet, les femmes rapportent plus de douleur abdominales à l'approche des règles et pendant leurs règles par rapport aux autres périodes du cycle menstruel (i.e. folliculaire, ovulatoire et lutéale) (Houghton *et al*, 2002). La période des menstruations étant caractérisée par une diminution marquée des niveaux circulants d'hormones ovariennes, les plus récentes études cliniques privilégient cette « chute d'hormones » en fin de cycle comme responsable de l'exacerbation des douleurs abdominales, directement ou indirectement (revue dans Heitkemper *et al*, 2009). On sait par exemple que les oestrogènes jouent un rôle dans la perception de la douleur et l'activité des afférences nerveuses véhiculant l'information sensitive depuis la périphérie (Bradesi *et al*, 2003), une piste de travail qui sera exploitée dans les projets.

Enfin, en se focalisant sur les seuls « *bowel habits* », il semble exister une différence marquée entre hommes et femmes, puisque ces dernières présentent plutôt des problèmes de constipation (SII-C) tandis que les hommes sont plus sujets au SII-D (Lee *et al*, 2001 ; Kim *et al*, 2007). Les états de constipation ou de diarrhées sont le résultat d'une combinaison d'effets entre altérations du transit intestinal et anomalies d'échanges d'eau dans le tube digestif (absorption, sécrétion). De récentes études chez l'animal ont conclu à l'influence des stéroïdes sexuels sur ces deux composantes, en particulier pour l'oestradiol capable à la fois d'un contrôle sur la sécrétion ionique dans les entérocytes –un support aux échanges d'eau dans l'intestin- (revues dans Hogan *et al*, 2009 ; O'Mahony *et al*, 2009) et sur l'activité musculaire de la paroi intestinale (Feng *et al*, 2009).

3.2. Influence d'une inflammation dans le côlon sur la fonction de reproduction : vers des troubles de la fertilité

3.2.a. L'utérus, un organe en continuelle activité inflammatoire : rôle des oestrogènes

L'endomètre utérin est un tissu sensible aux stéroïdes sexuels qui subit dès la puberté des cycles répétés de prolifération, de différenciation cellulaire, de dégénérescence puis de réparation. Cette plasticité hormono-dépendante répond à la fonction première de l'endomètre, celle d'être réceptif pendant quelques jours autour de l'ovulation à l'éventuelle implantation d'un blastocyste. S'il n'y a pas eu fécondation, cet endomètre dégénère, les menstruations éliminent l'épithélium et l'endomètre en excès, en préparation de la prochaine fenêtre d'implantation du cycle suivant. A la fois l'implantation et les menstruations apparaissent sous le contrôle des hormones ovariennes et sont assimilées à des événements inflammatoires caractérisés par une importante infiltration leucocytaire, accompagnée d'une expression marquée de cytokines et de prostaglandines (revue dans King et Critchley, 2010).

Les oestrogènes qui dominent la phase folliculaire sont pro-inflammatoires dans l'utérus, une activité qui conditionne les événements décrits ci-dessus. Au plan physiologique, il est surprenant de constater que l'activité de l'enzyme myéloperoxydase -MPO, un index d'infiltration neutrophilaire- dans l'utérus normal en oestrus chez la rate est près de trois fois supérieure à celle observée dans le côlon soumis à une inflammation expérimentale sévère (voir Houdeau *et al*, *Am J Physiol* 2005).

Outre le cycle endométrial, la stéroïdogenèse et l'ovulation sont aussi dépendants de médiateurs de l'inflammation. Ces cytokines sont produites par les cellules immunitaires infiltrant les ovaires et sont responsables d'une réaction inflammatoire aigue, locale, participant aux fonctions endocrines (inhibition ou stimulation de la stéroïdogenèse), à la croissance folliculaire, l'adaptation du lit vasculaire et la rupture du follicule mature à l'ovulation (revue dans Bukulmez et Arici, 2000).

De l'ensemble de ces mécanismes dépend la fertilité de l'individu.

3.2.b. Influence d'une colite sur le cycle sexuel et la contractilité myométriale

Une inflammation intestinale a des conséquences physiopathologiques extra-intestinales, notamment au niveau de la sphère génitale, entre anomalies menstruelles et problèmes de fertilité chez des patientes atteintes de la maladie de Crohn. Dans l'utérus voisin, nous avons vu que des médiateurs de l'inflammation sont naturellement produits par les ovaires et l'endomètre, et sont essentiels à la fonction de reproduction. Dans ce contexte, l'hypothèse était qu'une production accrue de médiateurs inflammatoires dans le tube digestif pourrait perturber les fonctions normales de l'appareil génital voisin.

Chez la rate, j'ai montré qu'une colite expérimentale induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS, un modèle pour la maladie de Crohn) s'accompagnait d'altérations fonctionnelles du muscle utérin au cours du cycle sexuel. Ces altérations affectaient aussi bien les contractions spontanées (activité cyclique) (**Fig 18**), que celles induites par des substances utéro-contractantes majeures comme l'ACh (l'innervation motrice dominante à l'oestrus) et l'OT (l'hormone hypophysaire essentielle à la parturition) [voir §2.3.a en première partie du mémoire] (**Fig 19**). De plus, ces altérations du myomètre étaient apparues d'autant plus importantes que le terrain inflammatoire dans le côlon était sévère, jusqu'à l'interruption complète du cycle sexuel, conséquence d'un blocage du processus inflammatoire naturel de l'utérus en préparation à la gestation (**Figs 18 et 19**). Cette transition vers la gestation est normalement pilotée par le pic d'oestrogènes en phase folliculaire, permettant d'une part l'ovulation et d'autre part l'hyperplasie des cellules endométriales nécessaire à l'implantation et au développement du futur embryon. Les oestrogènes sont également essentiels aux voies de signalisation des récepteurs périphériques à l'ACh (récepteurs muscariniques) et à l'OT (les oestrogènes facilitent le couplage des récepteurs à la production d'inositol phosphate nécessaire à la contraction musculaire : voir travaux §2.4. en première partie du mémoire). Dans une colite, l'administration d'oestradiol a restauré pour partie la physiologie de l'utérus, preuve d'une inhibition de la production ovarienne d'oestrogènes chez les animaux inflammés. Ce « défaut » d'oestrogènes est donc responsable du blocage du cycle sexuel et, par cascade d'évènements, des dystocies dynamiques.

Ces résultats ont été publiés dans American Journal of Physiology (Houdeau et al, 2005)

3.3. Contrôle hormonal de la réponse inflammatoire dans le côlon : la balance oestro-progestative comme *chef d'orchestre*

3.3.a. Influence du statut hormonal sur la réponse inflammatoire dans le côlon

Chez la femme, l'influence du statut hormonal sur l'activité des MICI est bien acceptée. Des récepteurs aux hormones ovariennes sont exprimés dans les muqueuses intestinales, principalement dans les cellules épithéliales et les cellules immunitaires (essentiellement les macrophages), mais les voies impliquées dans le contrôle de la réaction inflammatoire par ces hormones restent malgré tout peu étudiées.

Outre l'effet propre du cycle menstruel déjà abordé, des études cliniques ont conclu que l'utilisation à long terme d'une contraception orale (pilules oestro-progestatives = éthynyl oestradiol associé à un progestatif tels le gestadène ou le désogestrel) ou le traitement substitutif hormonal (TSH = éthynyl oestradiol avec ou sans progestatif) après la ménopause augmenteraient le risque de développer ces pathologies, ou leur rechute (Garcia-Rodriguez *et al*, 2005). Cependant d'autres travaux concluent l'inverse, au moins pour le TSH (Kane *et al*, 2008) et aucune étude ne permet de distinguer l'effet propre des oestrogènes de celui de la progestérone, que leur source soit endogène (production cyclique ovarienne) ou exogène (contraception orale et TSH).

Chez le rongeur, il a été constaté une amélioration des dommages tissulaires induits par une colite expérimentale chez des rates en proestrus par rapport aux mâles, un dimorphisme sexuel qui disparaissait si les mâles étaient préalablement supplémentés en oestradiol (Homma *et al*, 2005). Des effets modulateurs de l'oestradiol ont également été observés chez la souris, mais partagés entre des propriétés anti- ou pro-inflammatoires selon le modèle choisi de colite expérimentale, respectivement TNBS et DSS (dextran sulfate sodium ; Verdu *et al*, 2002). Quant à la progestérone, la littérature dédiée aux inflammations intestinales restait muette.

3.3.b. Le *macrophage migration inhibitory factor* (MIF): une cytokine cible des stéroïdes sexuels et un facteur de prédisposition aux MICI

Dans la perspective d'évaluer le potentiel d'action inflammatoire (anti- ou pro-) d'un produit, qu'il soit contaminant alimentaire ou aliment santé, la plupart des études se heurte au problème de la méconnaissance de l'état inflammatoire basal (teneur basale en cytokines), possiblement affecté par le statut hormonal, et qui conditionne l'amplitude de la réponse en présence de l'intrant alimentaire.

Notre intérêt s'est porté sur le MIF, une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans la pathogenèse des MICI (de Jong *et al*, 2001 ; Murakami *et al*, 2001) et présente à l'état préformé dans les cellules épithéliales (épithélium gastrique, entérocytes et colonocytes) et les macrophages résidents. Les données de la littérature utilisant les modèles murins d'inactivation de gène ou, à l'inverse, de surexpression de la protéine ont clairement montré que le niveau d'expression basal de cette cytokine conditionnait l'intensité de la réponse inflammatoire dans le côlon (de Jong *et al*, 2001 ; Ohkawara *et al*, 2005). En effet, le MIF est situé en amont de la production d'autres cytokines comme le TNF- α et l'IL-1 β , deux médiateurs essentiels à la pathogenèse et la maintenance de la colite. Le MIF est également capable d'inhiber la production de glucocorticoïdes (Calandra et Roger, 2003) dont l'action anti-inflammatoire est impliquée dans les phases de rémission des MICI. Dans des inflammations extra-intestinales, le MIF avait récemment été montré comme sensible aux oestrogènes (Ashcroft *et al*, 2003). Nous avons fait l'hypothèse que le statut hormonal chez la

femelle pouvait moduler l'expression basale de MIF dans l'intestin, conditionnant ainsi la libération de TNF- α et l'IL-1 β , donc l'intensité d'une colite lorsque la pathologie s'installe.

Chez la ratte adulte, nous avons mis en évidence une variation cyclique du contenu basal en MIF dans le côlon, avec un minimum en phase folliculaire (dominance oestrogénique) et un maximum en phase lutéale (dominance progestéronique), sans modification des cytokines témoins (TNF- α et IL-1 β) (**Fig 20**).

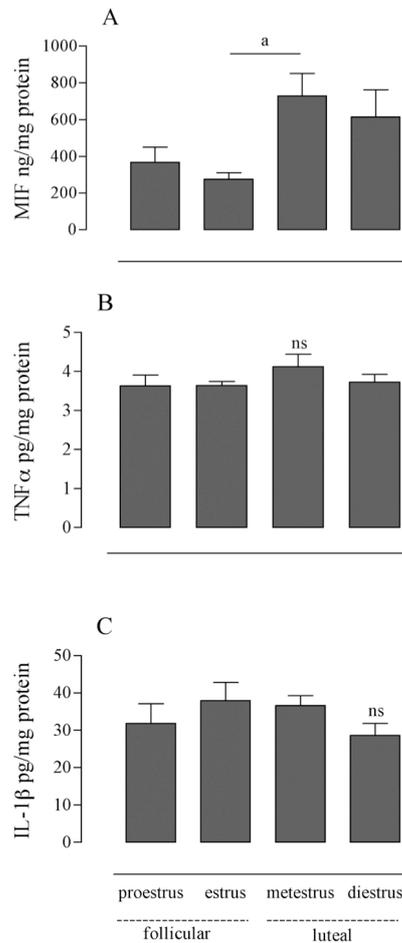


Figure 20 Tissue concentration of MIF (A), TNF- α (B), and IL-1 β (C) in the normal colon throughout the estrous cycle. Each bar represents mean \pm SEM of duplicate ELISA determinations performed in 6–8 animals per cycle stage. $P < .05$, ANOVA; ^a $P < .05$, Bonferonni's post test; ns: not significant vs all stages.

(extrait de Houdeau *et al*, Gastroenterology 2007)

Ces variations ont été reproduites chez l'animal castré, après traitement par l'oestradiol ou la progestérone, preuve de l'effet opposé des deux hormones sur l'expression basale de MIF. Ces régulations s'observent majoritairement dans les cellules épithéliales, première barrière d'exposition au contenu digestif, où le MIF apparaît comme cytokine sentinelle du système immunitaire inné. De telles variations ne s'accompagnent pas pour autant d'un micro-terrain inflammatoire dans les muqueuses intestinales, puisque l'infiltration neutrophilaire, appréciée par l'activité de la MPO, reste stable tout au long du cycle. Par contre, une teneur élevée en MIF s'est avérée un facteur de prédisposition au développement d'une réponse inflammatoire aigue. En effet, la sévérité d'une colite au TNBS est plus faible lorsqu'elle est induite en

phase folliculaire du cycle plutôt qu'en phase lutéale (**Fig 21**). L'influence nette de chaque hormone a été vérifiée après ovariectomie, où l'expression induite de MIF était inhibée par l'oestradiol et stimulée par la progestérone, modulant en retour la production de TNF- α et IL-1 β , donc l'intensité de la colite (**Fig 22**). De telles régulations peuvent expliquer les variations des symptômes gastro-intestinaux au cours du cycle menstruel chez les patientes atteintes de MICI, principalement dans la phase active de la maladie.

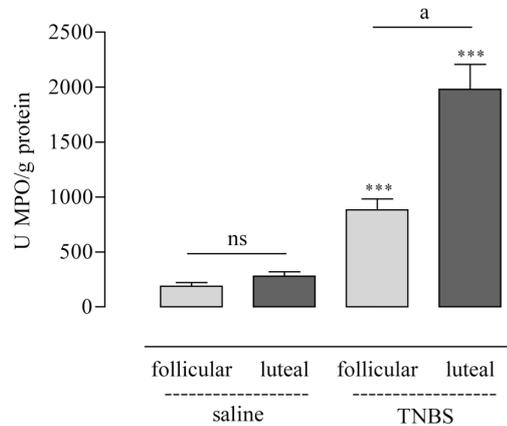


Figure 21 Effects of intracolonic administration of TNBS in either the follicular or the luteal phase of the estrous cycle on myeloperoxidase (MPO) activity in the colon. Values are mean \pm SEM. *** $P < .001$ vs the corresponding saline control; ^a $P < .01$; ns: not significant between groups. (extrait de Houdeau *et al*, Gastroenterology 2007)

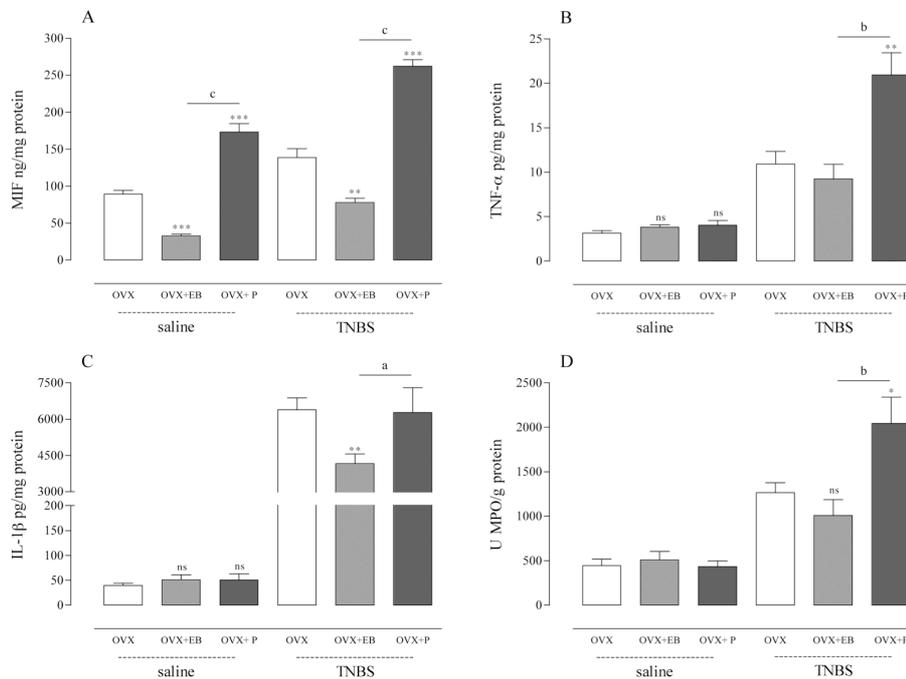


Figure 22 Influence of 17 β -estradiol (EB) and progesterone (P) treatment on colonic (A) MIF, (B) TNF- α , (C) IL-1 β concentrations, and (D) MPO activity in ovariectomized (OVX) rats with or without TNBS colitis. Values are means \pm SEM of duplicate determinations performed in 6–9 animals per group. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$; ns: not significant vs the corresponding control; ^a $P < .05$, ^b $P < .01$, and ^c $P < .001$ between groups. (extrait de Houdeau *et al*, Gastroenterology 2007)

Nous avons également montré dans ce travail que l'activité pro-inflammatoire de la progestérone, prise pour exemple, mettait bien en jeu l'expression de MIF. En effet, l'inflammation sous progestérone était significativement réduite par la seule administration d'un anticorps neutralisant la bioactivité du MIF, ayant pour conséquence directe une réduction de la production de TNF- α et une augmentation du taux circulant de corticostérone, une voie anti-inflammatoire normalement réprimée sous l'action du MIF.

*Cette étude a fait l'objet d'une collaboration avec une équipe américaine de l'Université de Yale (Dr Richard Bucala) et a été publiée dans la revue **Gastroenterology** (Houdeau et al, 2007)*

Dès cette démonstration, l'expression basale et induite de MIF dans le côlon s'est avérée un marqueur d'intérêt pour vérifier l'influence anti- ou pro-inflammatoire d'un xénobiotique perturbateur endocrinien, comme le BPA abordé plus avant dans ce mémoire.

3.4. Oestradiol et perméabilité paracellulaire épithéliale dans le côlon : une régulation fine de la fonction de barrière intestinale [Projet de Thèse de M^{elle} Viorica Braniste]

Deux types existent pour les récepteurs aux oestrogènes, entre la forme alpha (ER α) et la forme beta (ER β), de distribution ubiquitaire dans l'organisme, mais dont la balance d'expression varie selon les organes et tissus cibles. Les oestrogènes sont impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire, où chaque type des ERs présente un rôle opposé, stimulateur pour α et inhibiteur pour β . Dans l'intestin, la notion de ratio différentiel ER α /ER β est particulièrement intéressante à étudier, sachant que l'épithélium intestinal est en renouvellement permanent et rapide tout au long de la vie, s'effectuant par exemple en 3 à 5 jours chez le rongeur. On estime que plus de 10¹¹ cellules épithéliales sont éliminées par jour dans la lumière intestinale humaine. Chez l'homme comme chez le rongeur, les ER β prédominent dans le côlon (Campbell-Thomson *et al*, 2001 ; Konstantinopoulos *et al*, 2003), et les études chez la souris invalidées pour ce gène ont clairement montré l'importance de cette voie de régulation dans l'organisation et la maintenance d'une barrière épithéliale normale (Wada-Hiraike *et al*, 2006). Ainsi en comparaison des souris *wild type*, les KO ER β présentent un épithélium « immature », caractérisé par des jonctions intercellulaires anormales et une prolifération anarchique des cellules épithéliales. Or les jonctions intercellulaires (en particuliers les jonctions serrées) sont essentielles au contrôle de la perméabilité paracellulaire, une voie d'échanges à « géométrie variable » essentielle à la fonction de barrière intestinale, car permettant des échanges d'eau et d'ions, tout en limitant l'entrée d'agents potentiellement pathogènes pour l'organisme, aidé en cela par le système immunitaire associé à l'intestin appelé GALT (*gut associated lymphoid tissue*), l'appareil immunitaire le plus important du corps.

Sur ces bases, nous avons tout d'abord recherché chez la ratte si le statut hormonal pouvait affecter la perméabilité basale de l'intestin. Ces études ont été réalisées dans le cadre du stage M2R de Viorica Braniste, puis au cours de sa thèse. L'attention a été portée sur les variations naturelles de la balance oestro-progestative au cours du cycle sexuel, puis sur les effets propres de l'oestradiol et de la progestérone. La perméabilité paracellulaire dans le côlon a été mesurée selon deux méthodologies complémentaires, la première *in vivo* par le passage d'EDTA marqué à l'isotope ⁵¹Cr vers les urines (% de ⁵¹Cr-EDTA injecté dans le côlon et récupéré dans les urines de 24 heures), la seconde *in vitro* par la mesure en chambres de Ussing du passage paracellulaire de Dextran 4kD (macromolécule marquée au fluorophore

FITC) du pôle luminal au pôle muqueux sur segments de côlon prélevés à différents stades du cycle ovarien, ou chez l'animal ovariectomisé et supplémenté en stéroïdes.

Nous avons montré que la perméabilité paracellulaire du côlon n'était pas statique au cours du cycle mais plutôt versatile, diminuée en phase folliculaire puis augmentée en phase lutéale, sous la seule action des oestrogènes circulants (la progestérone étant sans effet) (**Fig 23**). L'utilisation d'agonistes spécifiques pour les ERs a conclu que ces variations dépendaient essentiellement d'une liaison de l'oestradiol sur ER β . La conséquence est une stimulation d'expression de l'occludine et de JAM-A (*junctional adhesion molecule*), deux protéines transmembranaires du complexe apical des jonctions serrées dont l'augmentation d'expression s'accompagne d'un resserrement des espaces intercellulaires, donc d'une diminution de perméabilité. Des résultats similaires ont été obtenus sur des cellules Caco-2 en culture) (**Fig 24**), montrant que des cellules intestinales humaines sont également sensibles à l'oestradiol, tout en confortant l'importance de la voie de régulation ER β dans le contrôle des échanges intestinaux paracellulaires.

Ces résultats ont été publiés dans The Journal of Physiology-London (Braniste et al, 2009)

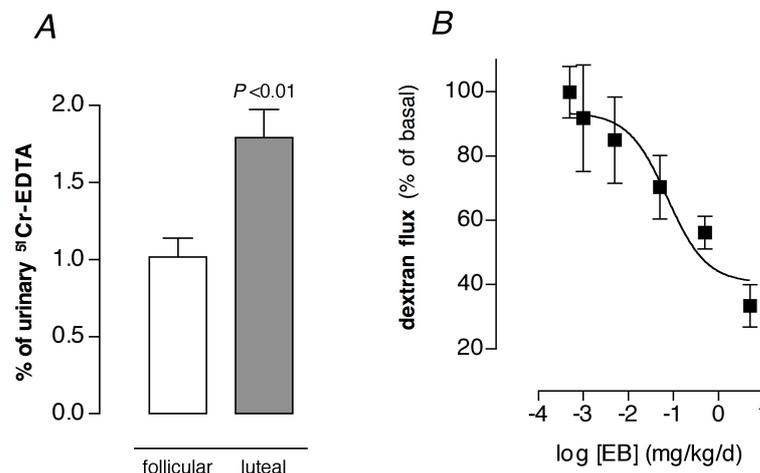


Figure 23 Effect of oestrous cycle (A) and dose effect of oestradiol on paracellular permeability in rats (B). A, *in vivo* ⁵¹Cr-EDTA recovery in urine 24 h after injection into the colon of rats in follicular and luteal phase. Bars are means \pm S.E.M. Statistical significance was assessed by Student's *t*-test. B, dose-response study of oestradiol benzoate (EB, 1 μ g to 5 mg (kg BW)⁻¹ day⁻¹ for 5 days, S.C.) in ovariectomized rats on paracellular FITC-dextran flux measured for 1 h in colon segments mounted in Ussing chambers. Values are means \pm S.E.M. of triplicate measurements in 5–8 rats per group (*P* < 0.05, ANOVA).

(extrait de Braniste *et al*, J Physiol-London, 2009)

Il est important de rappeler qu'en complément de la fonction rénale, le côlon participe à l'équilibre hydrique du corps, particulièrement au travers de l'absorption de Na⁺ et la sécrétion de Cl⁻, et le passage paracellulaire des molécules d'eau. Il est bien admis que les oestrogènes circulants au cours du cycle ovarien sont capables d'inhiber la sécrétion des ions Cl⁻ au travers de l'épithélium (un mécanisme rapide, non génomique et protéine kinase-dépendant) ayant pour effet de réduire le transport de fluides vers la lumière du côlon (revue dans O'Mahony *et al*, 2009). Cet effet anti-sécréteur combiné à la réduction des espaces intercellulaires concourt à présenter les niveaux élevés d'oestrogènes circulants comme responsables d'une rétention d'eau dans l'organisme, une situation souvent observée chez la femme dans les hauts statuts oestrogéniques (*e.g.* contraception orale, grossesse).

De tels effets sont particulièrement intéressants à replacer dans le contexte des patients souffrant de SII-C, la forme la plus courante de SII chez la femme (voir §3.1.b). La sécrétion d'eau vers la lumière intestinale, outre une voie naturelle d'élimination des eaux corporelles en excès, participe également à la lubrification des selles. Une hypothèse dans la prévalence du SII-C chez la femme repose sur l'action inhibitrice des oestrogènes potentiellement responsable d'une constipation idiopathique en limitant la sécrétion d'eau vers la lumière intestinale⁵. Enfin, à ce stade de nos observations, la notion que les oestrogènes, qu'ils soient endogènes ou exogènes, influent sur la perméabilité intestinale est essentielle à nos perspectives, en particulier dans l'évaluation des effets d'une exposition orale au BPA (ci-après).

3.5. Bisphénol A et barrière intestinale : un nouveau concept de perturbation endocrinienne [Projet de Thèse de M^{elle} Viorica Braniste]

Le BPA est à l'origine un œstrogène de synthèse non stéroïdien, produit par des chimistes russes à la fin du 19^{ème} siècle dans un contexte de recherche d'un composé oestrogénomimétique pour lutter contre les fausses-couches et la prématurité. Jamais utilisé en clinique humaine, car détrôné par un composé plus puissant, le dystilbène (DES), le BPA a été redécouvert dans les années 50 pour ses propriétés de plastifiant. Depuis cette période, le BPA est largement produit comme monomère entrant dans la synthèse de plastiques de type polycarbonate (PC) et de résines époxy (BADGE, *Bisphénol A Diglycidyl-Ether*) largement utilisés dans l'industrie alimentaire (bouteilles, revêtement intérieur des boîtes de conserves et canettes de boisson...). C'est actuellement l'un des composés chimiques produits avec le plus fort tonnage dans le monde (3,8 MT/an). Or dans certaines conditions (stérilisation, pH ou température), le BPA est facilement libéré par hydrolyse des polymères et contamine la chaîne alimentaire, révélant une exposition quotidienne chez l'homme. Le BPA est en effet le contaminant chimique le plus abondant et le plus fréquemment retrouvé dans les fluides humains (*e.g.* concentration urinaire moyenne de 1.33 µg/L, et jusqu'à 30 µg/L chez le nouveau-né) (Calafat *et al*, 2005, 2009). Fait important, les fœtus et nouveaux-nés sont exposés au BPA ingérés par leur mère. Ainsi chez la souris, de récents travaux ont montré un passage vers le fœtus de plus de 4% de la dose administrée aux mères, aux doses connues d'exposition humaine (Zalko *et al*, 2003). Chez l'homme, le BPA est retrouvé dans le sang ombilical, le placenta, le fluide amniotique et le lait maternel (Vandenberg *et al*, 2007).

Les propriétés oestrogéno-mimétiques du BPA constituent la principale inquiétude en santé humaine, étant donné que le composé se lie aux ERs, capable ainsi de perturber la balance hormonale essentielle au développement foetal, puis des nouveaux-nés. Par exemple, chez le rongeur, une exposition périnatale aux faibles doses de BPA altère de nombreuses fonctions en lien avec la reproduction, incluant le développement de la glande mammaire et de l'appareil génital, mais aussi les niveaux de production de gonadotropines et la cyclicité ovarienne (Bondesson *et al*, 2009). Chez le mâle, des effets sur le développement de la prostate, des glandes préputiales et de l'épididyme ont également été montrés. Les études animales ont également apporté la preuve que les fœtus étaient beaucoup plus sensibles à une exposition aux faibles doses de BPA que l'adulte, probablement dû à l'hypersensibilité aux oestrogènes qui caractérise la période de développement des organes, combinée à la capacité limitée du foetus à métaboliser le produit.

Comme mesure de protection, les agences sanitaires européennes ont fixé une dose

⁵ les symptômes de constipation chez les patientes SII-C apparaissent exacerbés dès la période pré-ovulatoire, période où les taux d'oestrogènes circulants sont les plus élevés (Heitkemper *et al*, 2003).

journalière tolérable (DJT) de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ pour l'homme, en appliquant un facteur d'incertitude de 100 à la dose sans effet nocif chez l'animal (DSENO) de 5 $\text{mg}/\text{kg}/\text{j}$ constatée dans les études classiques de toxicologie réglementaire. Or les démonstrations s'accumulent tendant à montrer que de plus faibles doses de BPA, inférieures à la DJT, restent très actives dans les tissus sensibles (sphère génitale, cellules de la glande mammaire...), en particulier en période périnatale où les oestrogènes participent au développement des organes et de leur fonction. De plus, une des caractéristiques des perturbateurs endocriniens est que leur effet maximal est souvent observé à de très faibles doses et se perd aux doses plus importantes, un effet dit « non monotone » passé inaperçu dans les études classiques de toxicologie réglementaire. Ces observations reposent la question du risque sanitaire pour l'homme, aux doses réelles d'exposition du consommateur, et du « seuil » de la DJT en vigueur.

3.5.a. Le BPA des plastiques alimentaires : effets d'une contamination orale chez l'adulte sur la fonction de barrière intestinale et la sensibilité viscérale

[ANR « Plastimpact », PNRA 2006 / coordinateur Thierry Pineau INRA UR 66]

Comme dans toute contamination alimentaire, l'appareil digestif est la première région de l'organisme exposée au BPA. Pour autant, l'intestin n'a jamais été considéré comme une cible potentielle du contaminant. Dans le projet ANR « Plastimpact », nous sommes partis de l'hypothèse que le BPA pouvait affecter tout compartiment cellulaire exprimant des ERs et connus comme sensibles aux oestrogènes naturels, dans l'intestin d'abord (perméabilité épithéliale et réponse immunitaire) et le système nerveux associé (sensibilité viscérale).

Chez la ratte adulte ovariectomisée et traitée 15 jours *per os* au BPA (DSENO, DJT et doses inférieures), nous avons montré, au cours de la thèse de Viorica Braniste, la capacité du BPA à diminuer de façon dose-dépendante la perméabilité paracellulaire dans le côlon, à l'identique de l'effet propre de l'oestradiol (**Fig 25**). Cet effet du BPA persiste à 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$, soit une dose dix fois inférieure à la DJT, la dose seuil réglementaire définie comme sans risque pour l'homme.

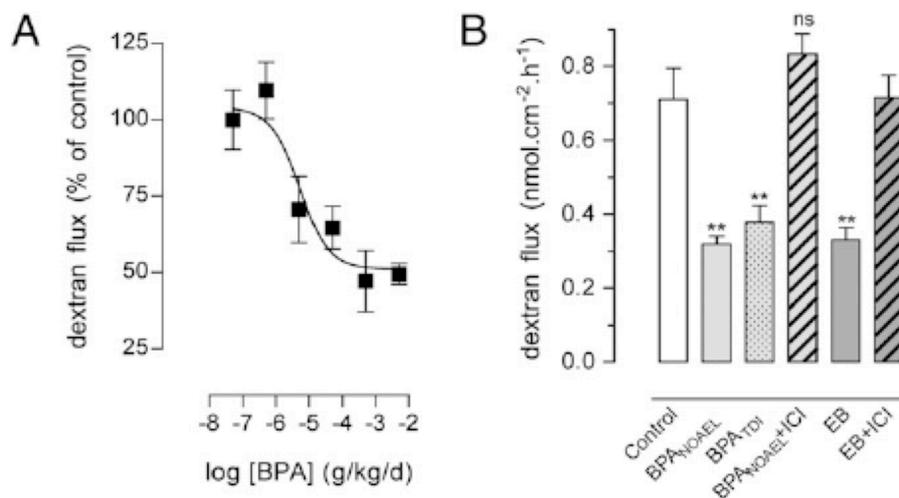


Fig. 1. Comparative effects of BPA and estradiol on intestinal permeability in OVX rats. (A) Dose effect of BPA (0.5 μg to 5 $\text{mg}/\text{kg}/\text{d}$ for 15 d by mouth) on colonic paracellular permeability (six to eight rats per group; $P < 0.05$, one-way ANOVA). (B) Effects of 15-d treatment with corn oil (control), BPA NOAEL or TDI, or EB with or without ICI 182.780 (ICI) on paracellular dextran flux (5–13 rats per group). ** $P < 0.01$ vs. controls; *ns*, not significant on one-way ANOVA. Bars are means \pm SEM of triplicate measurements.

Figure 25 (extrait de Braniste *et al*, PNAS 2010)

Comme pour l'oestradiol, l'action du BPA passe par une augmentation d'expression des protéines occludine et JAM-A qui déterminent les espaces intercellulaires au niveau des jonctions serrées, un effet reproduit sur cellules humaines Caco-2 en culture). Il est surprenant à ce stade des observations de constater que le BPA à 5 μ g/kg/j est aussi efficace que l'oestradiol à réduire la perméabilité paracellulaire, alors que le contaminant présente une activité 1000 à 10000 fois inférieure que l'hormone mère sur les ERs selon les référentiels cellulaires utilisés (Kuiper *et al*, 1997, 1998; Kim *et al*, 2001; Matthews *et al*, 2001). On sait cependant que le BPA présente une meilleure affinité pour ER β , où il agit comme un SERM (*Selective Estrogen Receptor Modulator*) capable d'augmenter le recrutement de co-activateurs par le récepteur (TIF2) (Routledge *et al*, 2000), augmentant ainsi le potentiel d'activité du BPA dans les tissus et organes où le récepteur ER β prédomine, le cas du côlon. En réduisant de façon chronique la perméabilité intestinale, nous avons suggéré que le BPA pouvait appuyer chez l'adulte la rétention d'eau provoquée par les oestrogènes naturels, limitant ainsi les échanges naturels de fluides au cours du cycle sexuel.

Nous montrons de plus que le BPA présente des propriétés anti-inflammatoires dans l'intestin, essentiellement observées à la dose DSENO, et s'exprimant par la diminution d'expression du MIF et de l'infiltration neutrophilaire dans une colite au TNBS. Enfin, le BPA_{DSENO} augmente chez la ratte castrée la sensibilité viscérale à la distension colorectale en conditions basales (*i.e.* hors inflammation), un effet bloqué par le ICI 182,780 et reproduit par l'oestradiol (**Fig 26**). Très probablement, cet effet hyperalgésiant du BPA résulterait d'une liaison aux ERs présents dans les centres d'intégration du message douloureux (moelle épinière et/ou centres supra-spinaux) et/ou les corps cellulaires de neurones de l'innervation sensitive du côlon (*i.e.* afférences nerveuses).

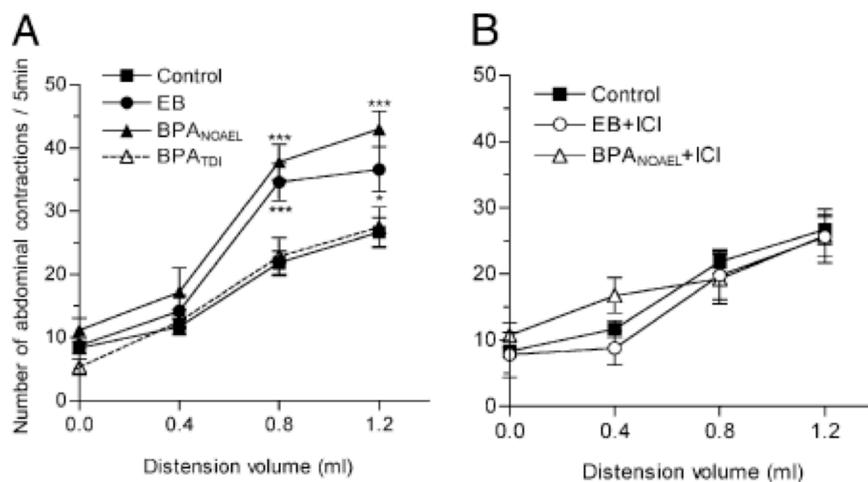


Fig. 5. Comparative effects of BPA and estradiol on VMR to colorectal distension in OVX rats exposed for 15 d to (A) corn oil (control), EB, or BPA NOAEL or TDI, and (B) with ICI 182.780 (ICI) (5–14 rats per group). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. controls (two-way ANOVA).

Figure 26 (extrait de Braniste *et al*, PNAS 2010)

Cette première partie de l'étude a montré pour la première fois que l'intestin était sensible au BPA ingéré, tout en révélant que les doses de référence en sécurité sanitaire des aliments restaient très actives sur trois compartiments cellulaires étroitement liés à la fonction de barrière intestinale : cellules épithéliales, immunitaires et nerveuses. Même si les doses DSENO et DJT ne sont pas celles auxquelles est exposé l'homme dans sa consommation courante, l'étude ouvre de nouvelles voies de recherches sur la caractérisation et l'évaluation

des effets des perturbateurs endocriniens d'origine alimentaire. La très grande sensibilité de l'intestin au BPA pourra contribuer à l'évaluation des risques et à la définition de nouveaux seuils acceptables d'exposition pour cette molécule, entre autres xénoestrogènes.

3.5.b. Période périnatale et BPA: conséquences d'une exposition *in utero* et pendant la lactation sur la fonction de barrière intestinale à l'âge adulte [Action Prioritaire AlimH 2008]

Dans la poursuite de ce travail, le Département « Alimentation Humaine » de l'INRA a soutenu notre projet de recherche sur le potentiel toxique du BPA pour l'intestin, en se basant cette fois sur les conséquences à long terme d'une exposition périnatale au contaminant. Nous avons utilisé le référentiel BPA_{DSENO}, seule dose expérimentale réelle en toxicologie réglementaire dans les études animales, la DJT pour l'homme n'en étant qu'une extrapolation mathématique (application d'un facteur d'incertitude lié notamment à l'espèce).

Dans le cadre du stage M2R de M^{elle} Aurore Jouault, et en continuité du travail de thèse de Viorica Braniste, nous avons montré qu'un traitement quotidien oral au BPA_{DSENO} chez la ratte gestante puis allaitante (jusqu'au sevrage des nouveaux-nés) aboutit à une fragilité de la fonction de barrière intestinale dans la descendance F1, essentiellement observée chez la femelle. Cette fragilité s'est traduit par une diminution marquée de perméabilité intestinale, qui persiste à l'âge adulte, accompagnée d'une exacerbation de la réponse inflammatoire face à une colite expérimentale. Dans ces conditions, les femelles exposées dès le stade foetal répondent plus sévèrement à l'inflammation par rapport aux témoins, montrant une augmentation marquée de l'infiltration neutrophilaire (activité MPO), de la production de MIF, de TNF α et de IL-1 β dans les muqueuses intestinales (les principales cytokines impliquées dans la pathogenèse et le maintien de la colite) (**Fig 27**). Chez le mâle F1 par contre, on note une diminution d'expression des ER β dans le côlon adulte, n'apparaissant pas chez la femelle, un mécanisme susceptible de protéger des effets néfastes du BPA dans l'intestin du mâle.

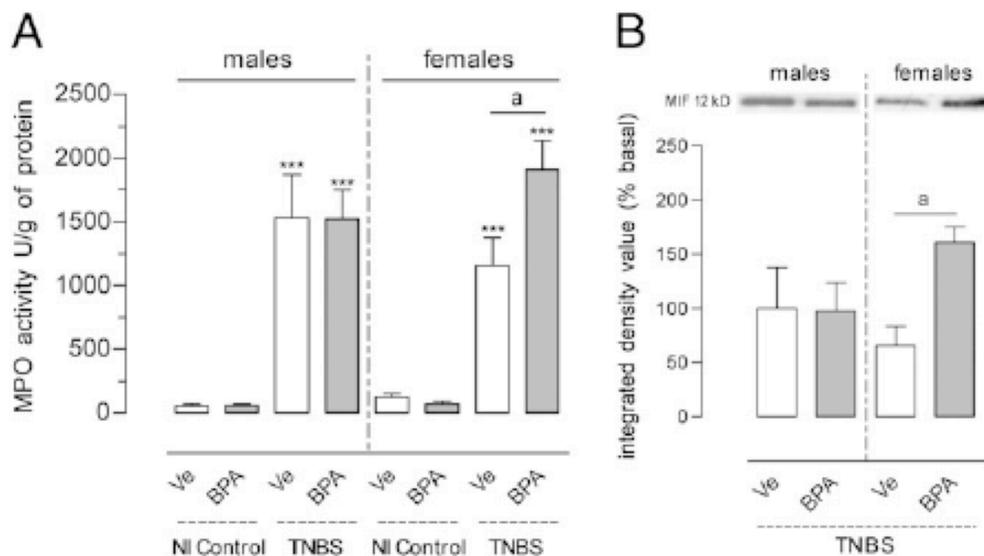


Fig. 7. (A) MPO and (B) Western blot analysis of MIF in the colon 24 h after induction of TNBS colitis in rats perinatally exposed to BPA NOAEL or vehicle (Ve). NI, noninflamed controls with intracolonic saline. Bars are means \pm SEM of duplicate measurements (five to eight rats per group). *** $P < 0.001$ vs. corresponding noninflamed controls; ^a $P < 0.05$ (t test).

Figure 27 (extrait de Braniste *et al*, PNAS 2010)

Une exposition périnatale au BPA produit donc l'effet inverse de l'activité anti-inflammatoire constatée chez l'adulte, lorsque celui-ci est directement exposé au contaminant (voir §3.5.a). Notre hypothèse repose sur l'idée qu'une première exposition au xénoestrogène à l'âge adulte mime les propriétés anti-inflammatoires de l'oestradiol déjà observées dans une colite (voir §3.3.b sur le MIF), alors que si l'exposition débute dès le stade foetal, la diminution chronique de la perméabilité intestinale est assimilée à un facteur de risque de développer une inflammation sévère à l'âge adulte. Nous faisons l'hypothèse que cette prédisposition pour la femelle serait la conséquence d'une maturation imparfaite du système immunitaire associé aux muqueuses intestinales. En effet, l'intestin est pratiquement stérile à la naissance. Sa perméabilité chez le nouveau-né est importante par rapport à l'adulte, une fenêtre permissive dans les échanges entre les muqueuses et la lumière intestinale, qui participe à l'éducation du GALT au fur et à mesure de la colonisation bactérienne (entre tolérance immunitaire de la flore et reconnaissance des pathogènes). En réduisant la perméabilité de l'intestin en période périnatale, le BPA pourrait freiner l'éducation de ces défenses immunitaires, altérant ainsi leur capacité à reconnaître plus tard des substances potentiellement nocives pour l'organisme. Cette hypothèse se vérifie dans nos projets en cours.

*L'ensemble de ces travaux a été publié dans les **Proceedings of the National Academy of Sciences-USA** (Braniste et al, 2010).*

4- PROJETS EN COURS & PERSPECTIVES

4.1. Priorités thématiques et projets structurants

Après deux premières années nécessaires pour m'imprégner de la culture *Gastroentérologie* dans l'unité NGN, les travaux que j'ai développés depuis 2006 m'ont convaincu qu'un projet structurant dans les domaines de l'endocrinologie du tube digestif (stéroïdes sexuels essentiellement) et de la toxicologie alimentaire (influence des *leurres hormonaux*) devait s'articuler autour des deux axes suivants :

- *un premier*, fondamental et très peu exploité dans la littérature, pour identifier les voies de régulations dans la fonction de *barrière* par les œstrogènes, la progestérone et les androgènes, chez l'animal castré (modèle pharmacologique, utilisation d'agonistes et d'antagonistes sélectifs des récepteurs) et entier (*e.g.* nouveau-né / période péripubère / au cours du cycle sexuel / différences liées au sexe),

- *un second*, s'appuyant sur les données précédentes et consacré à la notion de « perturbation endocrinienne », où la période d'exposition – essentiellement périnatale – est essentielle à prendre en compte pour appréhender la toxicité, souvent différée, des « nouveaux » contaminants issus de l'industrie alimentaire (entre autres), comme les bisphénols et les phtalates. Il est important de souligner que ces molécules, surtout connues pour leurs propriétés oestrogéniques, présentent bien souvent des activités anti- ou pro-androgéniques. Elles apparaissent ainsi potentiellement « pluripotentes » dans des systèmes physiologiques sensibles à la testostérone et/ou aux oestrogènes, le cas de l'épithélium intestinal.

Les projets actuellement développés dans l'équipe sont financés par le Département AlimH de l'INRA (Action Prioritaire 2009-11) et l'ANR (programme *Contaminant Environnement Santé 2010* : projet *PérinaTox* 2011-14). Ils s'appuient notamment sur l'importance de la

production progressive d'oestrogènes ovariens de la naissance (où les ovaires sont quasi « silencieux ») à la puberté dans le développement de l'épithélium intestinal et la maturation du système immunitaire sous-jacent. Le potentiel *perturbateur* du BPA aux faibles doses en période périnatale y est évalué. Ces deux programmes que je coordonne ouvrent sur un domaine de recherche beaucoup plus large que celui de la barrière intestinale *seule*, en alliant les compétences d'autres équipes de Toxalim sur le métabolisme des xénobiotiques (devenir dans l'organisme des perturbateurs ingérés ; Daniel Zalko), la cancérogenèse colorectale (Fabrice Pierre), la régulation des transporteurs de xénobiotiques (Anne Lespine), la mise en place des fonctions métaboliques (Laila Lakhal)... au final un large panel de compétences pour préciser le(s) danger(s) potentiel(s) de l'exposition périnatale au BPA (entre autres xénoestrogènes « d'intérêt » en toxicologie alimentaire) dans la prédisposition aux maladies chroniques chez l'adulte.

En parallèle à ces programmes, la connaissance des régulations par les stéroïdes sexuels dans l'intestin ouvre également des voies de recherche intéressantes dans le domaine du complément alimentaire à « bénéfique santé » et de la thérapeutique (action préventive et/ou traitement symptomatique des pathologies digestives et des troubles fonctionnels de l'intestin). En effet, les propriétés anti-inflammatoires de l'oestradiol associées à son pouvoir de diminution de la perméabilité intestinale sont intéressantes à exploiter dans l'aide aux patients souffrant de MICI ou de SII, essentiellement chez l'adulte : deux projets sont développés dans ce sens, présentés ci-après, l'un en commun avec Vassilia Théodorou et concernant les phytoestrogènes (*Bourse de Thèse CIFRE, M^{elle} Lara Moussa*), l'autre dans la perspective d'utilisation d'un agoniste ER β dans le contrôle pharmacologique de l'hyperperméabilité intestinale (*Bourse de Recherche CEPHALON, M^{elle} Viorica Braniste*).

4.2. Etude du potentiel inhibiteur du diarylpropionitrile, un agoniste sélectif des ER β , sur l'hyperperméabilité intestinale induite par un stress chez le rat : implications dans le SII [Bourse de Recherche CEPHALON, récipiendaire: M^{elle} Viorica Braniste]

Cephalon France (groupe Cephalon Inc, USA), en collaboration avec Le Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie (GFNG) et sous l'égide de la Société Nationale Française de Gastro-Entérologie (SNFGE), encourage des projets de recherche fondamentale sur les pathologies fonctionnelles intestinales et digestives. Dans le projet présenté avec M^{elle} Braniste, nous avons proposé de vérifier si la voie de signalisation ER β dans l'épithélium intestinal était une cible d'intérêt thérapeutique pour diminuer de façon concomitante la perméabilité intestinale et la douleur abdominale chez les patients SII.

Le SII figure en effet parmi les troubles fonctionnels digestifs à faible morbidité mais chronique, de prévalence exceptionnellement importante, estimée jusqu'à 20% de la population totale dans les pays industrialisés, touchant plus particulièrement les femmes (voir §3.1.b). Parmi les critères de diagnostic (Rome III), la douleur abdominale récidivante est le symptôme prédominant, accompagnant une modification du rythme des selles et de leur consistance. Bien que l'étiologie du SII reste obscure, l'hypothèse d'un état micro-inflammatoire de la muqueuse intestinale accompagné d'altérations des relations neuro-immunes est de plus en plus validée (Barbara *et al*, 2004 ; Tornblom *et al*, 2002 ; Gecse *et al*, 2008). Comme dit plus haut, une augmentation de la perméabilité basale a été vérifiée chez les patients souffrant du SII-D (Spiller *et al*, 2000), et suspectée dans le SII-C et -A (Piche *et al*, 2009), ce qui suggère qu'une altération de la barrière épithéliale peut favoriser le passage d'antigènes luminaux vers la muqueuse, produisant une réponse immune à l'origine des symptômes (Dunlop *et al*, 2006 ; Piche *et al*, 2009). Des facteurs psychologiques comme l'anxiété, des événements de vie stressants sont incriminés dans l'étiologie du SII (Drossman

et al, 2003). Dans un modèle animal, des situations de stress sont en effet associées à une augmentation de perception de la douleur viscérale, qui apparaît consécutivement à l'augmentation de la perméabilité intestinale (Ait-Belgnaoui *et al*, 2005). Chez la patiente SII, la perception de la douleur est maximale à l'approche et pendant les menstruations, une période pour rappel contemporaine d'une diminution marquée des oestrogènes circulants : dans notre hypothèse, il pourrait en résulter un « pic » de perméabilité intestinale en fin de cycle menstruel et, par voie de conséquences, une perception exacerbée de la douleur abdominale.

Compte tenu de l'importance de la voie de régulation ER β dans la modulation oestrogénique de la perméabilité intestinale, l'objectif de ce projet est de déterminer si l'administration de l'agoniste DPN dans un modèle animal d'hyperperméabilité induite par un stress aigu (dit « stress de contrainte » par l'immobilisation des pattes antérieures de l'animal pendant 2 heures) est susceptible de diminuer l'hyperalgésie viscérale, par une action mettant en jeu la réduction de perméabilité paracellulaire intestinale. Ces effets seront comparés à ceux de l'hormone mère oestradiol et de l'agoniste des ER α (propylpyrazole triol, PPT). Nous vérifierons que l'éventuelle diminution de la perméabilité épithéliale induite par le DPN est contrebalancée par l'administration préalable de l'antagoniste pur des ERs, le ICI 182,780, signant un effet génomique du produit. Parallèlement, la sensibilité viscérale à la distension colorectale en réponse au stress chronique sera évaluée en présence et l'absence de DPN, tandis que le niveau d'expression de la protéine Fos (un marqueur d'activation neuronale) sera appréciée en histologie dans la corne dorsale de la moelle épinière (site d'intégration de la douleur périphérique) dans chaque situation de traitement.

Les données déjà obtenues par Viorica Braniste sont très encourageantes, puisque l'administration de DPN chez la ratte adulte en situation de stress aboutit à une diminution marquée de la réponse douloureuse à la distension colorectale (bloquée par l'antagoniste ICI des ERs), évaluée en diestrus du cycle sexuel, sans effet du PPT (**Fig 28**). Ces premières observations confirment la voie ER β comme importante dans la modulation des symptômes de douleur abdominale dans un modèle animal de SII.

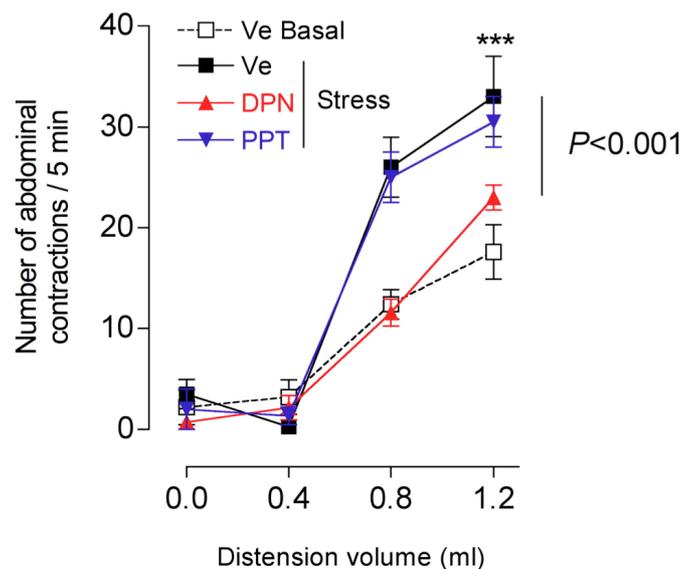


Figure 28 Influence d'un prétraitement chez la rate (5 jours, *sc*) à l'agoniste de ERalpha (PPT) ou de ERbeta (DPN) sur l'hyperalgésie viscérale à la distension colorectale en conditions de stress aigu ($n=8$ par groupe ; *** $P < 0,001$, ANOVA).

4.3. Isoflavones du germe de soja et SII : vers une nouvelle allégation fonctionnelle? [Bourse de Thèse CIFRE, co-encadrant avec Vassilia Théodorou de M^{elle} Lara Moussa, 3^{ème} année]

La graine de soja (*Glycine max* (L.) Merr) est particulièrement riche en molécules provenant du métabolisme secondaire de la plante incluant vitamines, triterpènes et flavonoïdes (isoflavones), pouvant agir seuls ou en interaction. La distribution de ces substances varie significativement d'un compartiment à l'autre de la graine et, bien que le germe de soja ne représente que 2 à 3% de sa masse totale, il est particulièrement concentré en ces différents composés (Hubert *et al*, 2005). Cependant, en raison notamment de ses propriétés sensorielles indésirables (amertume, astringence), le germe est fréquemment éliminé lors des procédés de fabrication des produits alimentaires dérivés du soja, devenant ainsi un co-produit industriel non valorisé.

La société Genibio Industrie a récemment développé un ingrédient fermenté à partir des lots de germe de soja broyés. Le marché visé pour la valorisation de cet ingrédient innovant étant celui du complément alimentaire. L'évaluation de ses propriétés biologiques, en vue de proposition d'allégations santé, est à l'origine du projet de thèse de Lara Moussa, le domaine d'application santé visé étant celui des troubles fonctionnels digestifs, du SII en particulier. Le procédé de fermentation lactique du germe de soja confère à l'ingrédient final une amélioration de ses propriétés organoleptiques (diminution de l'amertume et de l'astringence) tout en préservant sa teneur en molécules bioactives telles que des inhibiteurs de protéases (facteur de Bowman Birk) et des phytoestrogènes (isoflavones du type Génistéine, Daidzéine et Glycitéine) (Hubert *et al*, 2005). De plus, l'ingrédient fermenté présente un potentiel anti-oxydant supérieur à celui du germe de soja natif (Hubert *et al*, 2005). En préalable à ce projet, j'avais montré dans le cadre des stages de Arnaud Fabre et de Lucile Chemin (2006-08) les propriétés anti-inflammatoires du germe broyé et fermenté dans une colite expérimentale chez la ratte (: APPEL A PROJETS RECHERCHE ET TRANSFERT DE TECHNOLOGIES (APRT) - REGION MIDI-PYRENEES), essentiellement dues à l'activité oestrogénique des isoflavones (car bloquées par l'ICI 182,780). Ces propriétés anti-inflammatoires passaient notamment par une diminution de la production de MIF, cytokine cible des oestrogènes (voir §3.3.b).

Concernant le SII, notre laboratoire a récemment apporté la preuve que les selles des patients SII-D ont un niveau d'activité sérine-protéase anormalement élevé en comparaison de sujets sains (Roka *et al*, 2007). L'hypothèse que cette activité puisse être responsable des troubles de la perméabilité colique et de l'hypersensibilité viscérale par activation des récepteurs activés par des protéases (en particulier les *Protease Activated Receptors* (PAR)-2 exprimés par les cellules épithéliales) a été récemment confirmée dans l'unité (Gecse *et al*, 2008). En effet, les surnageants de selles de patients SII-D perfusés *in vivo* chez la souris par voie rectale augmentent la perméabilité paracellulaire dans le côlon et entraînent un état d'hyperalgésie à la distension colorectale (Gecse *et al*, 2008). Nous avons vu que le statut hormonal chez la femme influe considérablement sur la perception des symptômes douloureux du SII, exacerbée lorsque le taux d'oestrogènes plasmatiques chute en fin de cycle. Par exemple chez la souris, une ovariectomie induit une hyperalgésie viscérale quatre semaines après l'intervention et persistant pendant sept semaines. Cette hyperalgésie est bloquée par un traitement chronique par l'œstradiol, suggérant le rôle protecteur de l'hormone vis-à-vis de l'hypersensibilité viscérale (Sanoja et Cervero, 2008). Toutefois des controverses existent, puisque chez la ratte une ovariectomie supprime cette fois l'hypersensibilité viscérale induite par un stress aigu et que l'injection d'œstradiol ne prévient pas l'hyperalgésie liée au stress, suggérant une activité globale plutôt pronociceptive (Bradesi *et al*, 2003). Reste cependant que les premiers résultats obtenus dans le cadre du projet Cephalon favorise l'idée que la

stimulation des ER β qui prédominent dans l'intestin s'accompagne d'une réduction de l'hypersensibilité viscérale induite par un stress chez la ratte au cours du cycle sexuel, donc non castrée (voir §4.1), laissant entrevoir le potentiel bénéfique des isoflavones du germe de soja, la Génistéine par exemple ayant une affinité meilleure pour le type β des ERs.

Compte tenu, d'une part, des données récentes sur la physiopathologie du SII et, d'autre part, de la composition en éléments bioactifs du germe fermenté, une valorisation de ce produit en tant que complément alimentaire ciblée vers le SII semble prometteuse. En effet, le facteur de Bowman Birk fait partie d'une famille d'inhibiteurs de sérines-protéases connue sous le nom de BBI (*Bowman Birk Inhibitor*; Birk, 1985), des peptides de petite taille (60 à 90 acides aminés) possédant un nombre élevé (7) de ponts disulfures et résistant à la chaleur (Jaulent *et al*, 2004). Une étude clinique récente montre un effet bénéfique du traitement par un concentré de BBI chez des patients souffrant de RCH (Lichtenstein *et al*, 2008), une pathologie caractérisée également par un niveau élevé d'activité serine-protéase dans la lumière colique (Roka *et al*, 2007). De plus, le germe de soja fermenté est particulièrement riche en isoflavones dont les mécanismes moléculaires de reconnaissance par les ERs sont comparables à ceux de l'œstradiol, tout en gardant une puissance moindre que l'hormone mère (van Lipzig *et al*, 2004). Malgré cela, la présence majoritaire des isoflavones dans l'ingrédient fermenté sous leur forme aglycone confère des propriétés oestrogéno-mimétiques intéressantes au produit, étant donné que les isoflavones traversent la barrière intestinale sous cette forme (Setchell *et al*, 2002), généralement considérée comme la forme bioactive.

Les données obtenues appuient très largement nos hypothèses. Tant l'augmentation de la perméabilité intestinale (*in vivo* et *in vitro*) que la douleur viscérale induite par un stress aigu sont significativement atténuées par l'administration *per os* pendant 15 jours de germe broyé et fermenté (dose équivalente à 0,45 mg d'isoflavones forme aglycones/kg/j), à l'identique d'un traitement oral avec de l'œstradiol (0,6 mg/kg/j). Ces effets sont bloqués par le ICI 182,780 donc bien dépendants d'une liaison aux ERs. De façon intéressante, l'activité oestrogéno-mimétique du germe fermenté ne semble pas altérer la fonction ovarienne, puisque les femelles présentent des cycles successifs réguliers et que l'on retrouve à l'état basal les fluctuations naturelles de perméabilité intestinale, dépendantes des oestrogènes endogènes (voir §3.4 et Braniste *et al*, 2009). En d'autres termes, l'ingrédient à base de soja ne se comporte pas comme un perturbateur endocrinien chez la femelle adulte, une notion importante à souligner dans le contexte d'un complément alimentaire à finalité « santé ». Enfin dans les deux sexes, l'activité protéolytique augmentée par le stress aigu dans la lumière colique est significativement réduite par le traitement oral à l'ingrédient fermenté. Cet effet semble logiquement relever de l'activité BBI du germe de soja, car insensible à l'antagoniste ICI.

Les observations de M^{elle} Moussa ont été présentées en communication orale au congrès annuel de l'*American Gastrointestinal Association* en 2010. Un article de recherche est en cours de rédaction.

4.4. Effets précoces du BPA sur le développement de la barrière intestinale et la programmation métabolique du foie et du tissu adipeux : conséquences à long terme pour l'adulte [ANR « PERINATOX » 2011-14, appel à projets « Contaminant, Environnement, Santé 2010 », coordinateur : Eric Houdeau] & [Projet de Thèse de M^{elle} Nabila Moussaoui]

4.4.a. Données préalables sur la maturation périnatale de l'axe intestin-foie [Projet proposé à l'INRA et la Région Midi-Pyrénées pour le financement de thèse de Nabila Moussaoui].

Avant d'entrer dans la description même du projet *PérinaTox*, il convient de rappeler que la période périnatale constitue un moment unique au cours de la vie pendant lequel les muqueuses du tube digestif, *a priori* stériles à la naissance, se préparent à une multitude de stimulations antigéniques (microbiennes, alimentaires) nécessaires au développement de la fonction de barrière intestinale. Toute perturbation au cours de cette période est considérée comme facteur de risque dans le développement chez l'enfant, puis l'adulte de troubles fonctionnels et/ou de pathologies intestinales. En parallèle de l'intestin, le foie connaît aussi de profonds changements en période périnatale, mettant en place ses fonctions métaboliques (détoxification, substrats énergétiques), sa capacité de réponse inflammatoire (protéines de phase aigüe, cellules de Kupffer qui représentent plus de 50% des macrophages résident de l'organisme) et la synthèse des acides biliaires. C'est en particulier au fur et à mesure de la colonisation bactérienne de l'intestin que le foie constitue et adapte son pool de protéines de phase aigüe impliquées dans la réponse inflammatoire systémique précoce, témoignant d'une synchronisation dans le développement de l'axe intestin-foie.

Si l'allaitement puis la diversification progressive dans l'alimentation du nouveau-né participent aux mécanismes de tolérance et à l'établissement d'une barrière intestinale mature, aucune étude ne s'est intéressée à l'influence des stimulations hormonales en période périnatale, qu'il s'agisse de stéroïdes endogènes ou de xénoestrogènes d'origine alimentaire (contaminants chimiques ou complément nutritionnel type isoflavones). Par ailleurs, la chronologie des événements dans la maturation couplée de l'intestin et de la fonction hépatique reste largement inexplorée.

A la naissance, l'immaturation de la barrière intestinale se traduit par une perméabilité paracellulaire élevée entre les entérocytes, participant au cross-talk entre le contenu luminal et les muqueuses digestives immatures (Catassi *et al*, 1995). Cette période de perméabilité permissive [récemment vérifiée chez le rat au laboratoire] est contemporaine de la maturation hépatique, dépendant de la nature et de la quantité des stimulations bactériennes dans l'intestin (Fak *et al*, 2008). Ces processus parallèles se déroulent durant les premières semaines de vie et précèdent la fermeture progressive des jonctions serrées entre les cellules épithéliales, pour fournir une barrière efficace contre des agents potentiellement pathogènes et une fonction hépatique adaptée à l'environnement du nouveau-né, qu'il conservera tout au long de sa vie. Dans la mesure où l'équipement en ERs est présent à la naissance (voir §4.2.c), une relation étroite doit exister entre la production progressive d'oestrogènes dans les premières semaines de vie, le développement de l'épithélium intestinal et la maturation hépatique. C'est d'une synchronisation correcte entre la colonisation bactérienne et la fermeture de l'épithélium que doit dépendre ultérieurement une barrière intestinale efficace et une réponse hépatique adaptée à une éventuelle inflammation. Dans ce contexte, l'influence d'un leurre oestrogénique comme le BPA en période périnatale est à considérer comme facteur de risque, avec de possibles répercussions chez l'enfant plus âgé, puis chez l'adulte (réponses immunitaires dans l'intestin et le foie).

4.4.b. Les apports de *PérinaTox* : un projet ANR structurant pour Toxalim

De récentes études font état d'un lien entre l'exposition à de faibles doses de perturbateurs endocriniens durant la période périnatale et l'apparition de maladies à l'âge adulte. Ces travaux soulignent l'exposition périnatale au BPA comme facteur de risque dans le développement de l'obésité, du diabète de type II, des anomalies de comportement... autant de « signaux d'alerte » conduisant les agences d'évaluation du risque (FDA ou ANSES, ex-AFSSA) à réévaluer les niveaux d'exposition chez l'homme.

La contamination des aliments et boissons par le BPA présent dans les plastiques alimentaires induit une exposition importante et chronique des consommateurs, avec des enjeux majeurs de santé publique lorsque la contamination concerne des femmes enceintes (développement fœtal) puis des bébés. La période périnatale est donc au cœur du nouvel enjeu sanitaire des perturbateurs endocriniens, particulièrement au vu des effets délétères aux faibles doses de BPA (inférieure à la DJT) chez l'animal, compatibles avec les expositions populationnelles chez l'homme, sur des organes comme l'intestin (Braniste *et al*, 2010), le foie et le tissu adipeux (Rubin et Soto, 2009). Cependant, les mécanismes impliqués dans ces altérations et leurs conséquences sur l'augmentation de la prévalence de pathologies chez l'adulte restent à élucider. Le projet *PérinaTox* propose d'évaluer l'effet d'une exposition périnatale à de faibles doses de BPA sur le développement fonctionnel et concomitant de l'intestin, du foie et du tissu adipeux. L'impact de cette exposition sur la sensibilité à développer des maladies inflammatoires (MICI, SII), néoplasiques (cancer colorectal) ou métaboliques (obésité, diabète) chez l'adulte sera aussi évalué. Nous avons montré chez le rat que l'exposition au BPA à l'âge adulte réduisait la perméabilité et la réponse inflammatoire dans l'intestin, tout en augmentant la sensibilité viscérale lorsque le BPA était testé chez la femelle ovariectomisée (Braniste *et al*, 2010). Par contre, l'exposition chronique au BPA en période périnatale affaiblit la fonction de barrière intestinale car induit une augmentation de la réponse inflammatoire dans la descendance femelle à l'âge adulte (voir §3.5.b). De plus, elle réduit l'expression intestinale des ER β chez les mâles F1 adultes, sachant qu'une baisse d'expression de ce même récepteur est observée dans les stades ultimes de cancer colorectal (revue dans Kenelly *et al*, 2008). Ceci suppose que l'exposition précoce au BPA peut altérer de façon substantielle sur le long terme des fonctions d'organes et représenter un facteur de risque dans le développement de maladies chez l'adulte. D'autres études ont aussi montré que l'exposition périnatale au BPA induit des perturbations métaboliques au niveau du tissu adipeux et du foie, conduisant à un surpoids chez les rongeurs adultes, encore une fois plus particulièrement chez la femelle (Somm *et al*, 2009).

Nous proposons de rechercher les mécanismes qui sous-tendent le développement de ces perturbations hormonales et de caractériser l'effet de l'exposition périnatale au BPA. Pour cela, *PérinaTox* a rassemblé les compétences de trois partenaires autour de plusieurs challenges :

- 1) Décrire les étapes de développement chronologique coordonné de l'intestin, du foie et du tissu adipeux et étudier l'effet du BPA sur ces processus de maturation. En particulier nous évaluerons l'influence d'une *fermeture précoce* de la voie d'échange paracellulaire dans l'intestin sur le développement conjoint de protéines d'inflammation rapide dans le foie, du développement des cellules de Kupffer et le profil cytokinique dans le foie ([collaboration inter-équipes Toxalim](#) : NGN + TIM, *Toxicologie Intégrative & Métabolisme*, Laila Lakhal et Pascal Martin). En parallèle, nous regarderons l'influence du BPA périnatal sur l'expression des transporteurs de xénobiotiques par les cellules épithéliales (protéines spécialisées dans l'efflux extracellulaire des xénobiotiques). Certains étant sensibles aux

- oestrogènes, ces transporteurs sont susceptibles d'être affectés par la présence de bisphénols, une notion importante à prendre en considération compte tenu d'une suspicion de résistance aux médicaments (chimiothérapie notamment) en présence de perturbateurs endocriniens (NGN + TTR, *Transporteurs Membranaires & Résistance*, Anne Lespine),
- 2) Vérifier si la baisse d'expression de ER β induite par le BPA chez les mâles (*cf* Braniste *et al*, 2010) prédispose au développement du cancer colorectal (collaboration inter-équipes Toxalim : NGN + PPCA, *Prévention & Promotion de la Carcinogénèse par l'Aliment*, Fabrice Pierre),
 - 3) Evaluer l'impact de l'exposition périnatale au BPA sur les fonctions du foie et du tissu adipeux de l'adulte en relation avec les voies métaboliques et l'inflammation chronique, principaux facteurs à l'origine du syndrome métabolique (collaboration Toxalim/INSERM, Rennes et Toulouse),
 - 4) Evaluer sur des modèles cellulaires d'origine humaine (foie : HepaRG ; intestin: Caco-2 ; T84 et LS ; adipocytes : lignées primaires), les effets du BPA observés chez le rongeur (collaboration Toxalim/INSERM, Rennes et Toulouse),
 - 5) Mesurer systématiquement les niveaux d'exposition tissulaire et cellulaire au BPA et à ses principaux métabolites (collaboration inter-équipes Toxalim : NGN + TIM + PPCA + TTR + MeX, *Métabolisme des Xénobiotiques*, Daniel Zalko).

Ce projet sur 4 ans a reçu l'approbation de l'ANR pour un montant total de 750 K€, les deux tiers étant attribués à l'unité Toxalim du centre INRA de Toulouse (5 équipes). Finalement nous avons rassemblé des équipes possédant des champs d'expertise adaptés et complémentaires en toxicologie, endocrinologie, métabolisme, physiologie, biologie cellulaire et moléculaire, biochimie et bio-analyse (**Fig 29**). Nous attendons du projet *PérinaTox* un éclairage nouveau sur les mécanismes impliqués dans les effets génériques et transgénérationnels de l'exposition périnatale aux xénoestrogènes, et au rôle du dialogue entre les organes dans la mise en place des perturbations à l'âge adulte. Les résultats devraient contribuer à réévaluer le danger lié à l'utilisation du BPA chez les personnes à risque, en particulier la femme enceinte, les nouveaux-nés et l'enfant jusqu'à sa puberté, trois situations récemment reconnues par l'ANSES comme périodes critiques d'exposition au BPA (saisine 2010-SA-0040 du 2 mars 2010).

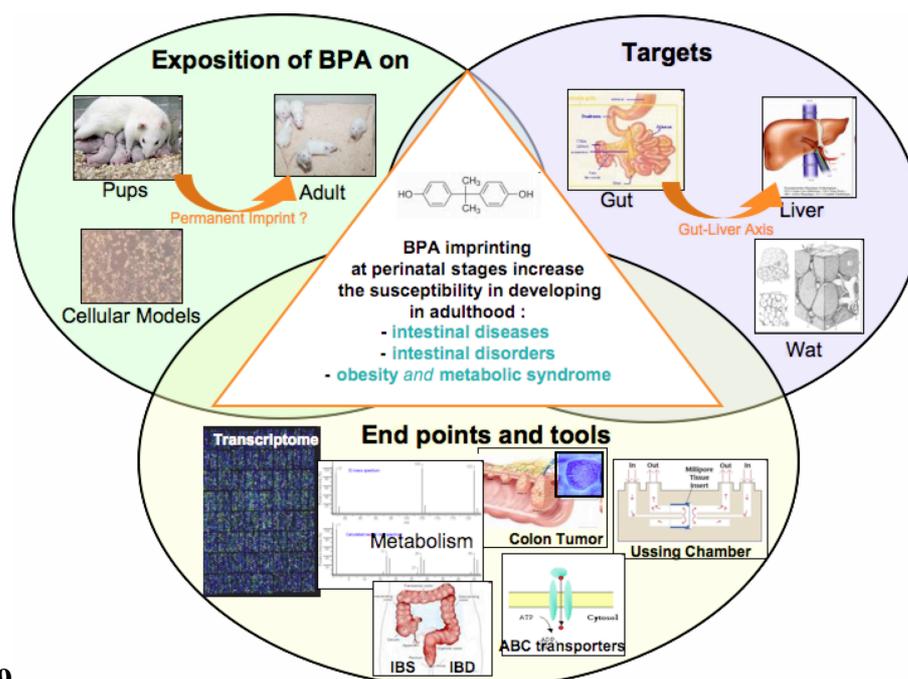


Figure 29

Encadrement,

Dans notre équipe, Nabila Moussaoui, doctorante dont la thèse est co-financée par l'INRA (Départements « Alimentation Humaine » et « Santé Animale ») et la Région Midi-Pyrénées, développe les outils pharmacologiques nécessaires pour appréhender l'importance d'une perméabilité intestinale élevée à la naissance dans la maturation conjointe des fonctions hépatiques, en présence et en l'absence de faibles doses de BPA (< DJT). Son stage est réalisé sous la co-direction de Pascal Martin (Equipe *Toxicologie Intégrative & Métabolique*).

Parallèlement, Viorica Braniste, après avoir validé sa thèse début 2011, est aujourd'hui engagée en stage post-doctoral sur les fonds ANR pour identifier les voies de signalisation oestrogénique perturbées par le BPA en période périnatale (perméabilité intestinale, jonctions serrées, sensibilité oestrogénique et profil cytokinique des muqueuses en développement) et les conséquences dans la descendance adulte.

4.4.c. Période périnatale : plus loin dans la définition d'hypersensibilité à l'oestradiol et aux xénoestrogènes

Depuis 2010, nous avons progressé dans la compréhension des mécanismes naturels de maturation de la barrière intestinale chez le nouveau-né et des altérations produites par l'exposition périnatale au BPA pour la descendance, et ce dès $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ soit la plus faible dose ayant un effet sur la perméabilité paracellulaire colique (pour rappel dix fois inférieure à la DJT). Un premier travail réalisé conjointement par M^{elles} Moussaoui et Braniste a permis d'obtenir une vue précise, *in vivo*, de la diminution postnatale de perméabilité paracellulaire dans l'intestin des deux sexes (process naturel de maturation appelé *gut closure*). Cette cinétique témoigne de la *fermeture* progressive des voies d'échanges paracellulaires, pour assurer ensuite une barrière efficace envers les toxines et antigènes variés (**Fig 30**).

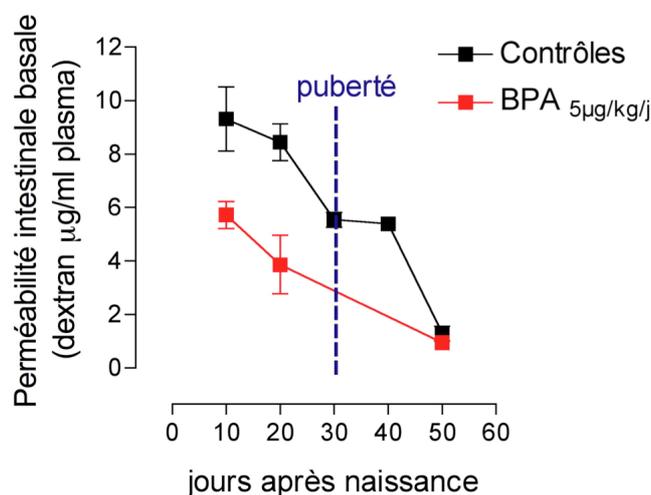


Figure 30 Perméabilité paracellulaire totale au Dextran administré *per os* dans l'intestin de rat de la naissance à l'âge adulte - Influence de l'exposition périnatale au BPA. Exemple chez l'individu femelle.

Administré quotidiennement aux mères gestantes puis allaitantes, nous montrons que le $\text{BPA}_{5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}}$ diminue très significativement la perméabilité intestinale chez le nouveau-né dans les deux sexes, un effet confirmé *in vivo* (cinétique plasmatique du dextran 4kD administré *per os*) et *in vitro* (segments de côlon montés en chambres de Ussing) (**Fig 30**). Comme

observé chez l'adulte, cette réduction des espaces intercellulaires s'accompagne d'une augmentation d'expression des protéines de jonctions serrées occludine et JAM-A dans le côlon du nouveau-né âgé de 10 jours. Une conséquence à cet âge est la diminution significative du passage basal de LPS (lipopolysaccharide des bactéries Gram⁻), utilisé ici comme témoin du passage libre d'informations lumineuses d'origine bactérienne et participant au développement du système immunitaire des muqueuses (**Fig 31**). Ces observations confortent la prise en compte de la période périnatale comme période *clef* dans la maturation de l'intestin et de « fenêtre critique » d'exposition au BPA, limitant les échanges de la lumière de l'organe aux muqueuses immatures. Nous proposons dans le cadre du projet *Périnatos* d'en définir les conséquences en termes de tolérance orale et de sensibilisation du système immunitaire chez l'adulte (projet de Sandrine Ménard, CR2 nouvellement recrutée dans l'équipe).

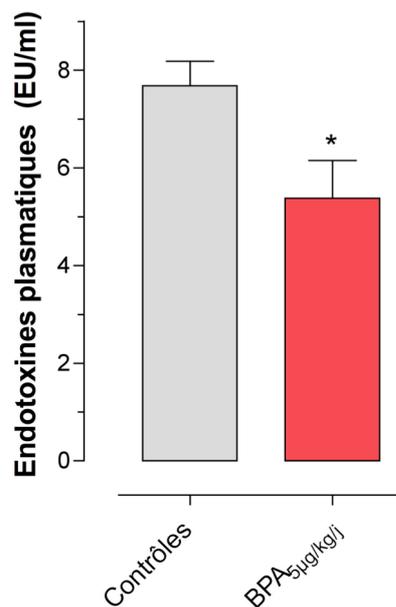


Figure 31 Concentration basale de LPS dans le sang porte chez le nouveau-né femelle âgé de 10 jours et exposé ou non au BPA en période périnatale. *P<0,05.

En qPCR, l'expression des ER β dans le côlon est maximale le dernier jour de la gestation, et diminue progressivement chez le nouveau-né pour atteindre au sevrage (21 jours) un niveau constant et conservé tout au long de la vie (**Fig 32a**). Cette surexpression des ER β peut à elle seule expliquer la puissance d'activité du BPA chez le fœtus et le nouveau-né, d'autant que les ERs sont montrés fonctionnels à la naissance, comme en témoigne l'effet dose-réponse pour l'oestradiol chez le raton femelle (**Fig 32b**), à une période de vie où les ovaires n'ont pas pleinement les capacités enzymatiques pour produire en quantité cette hormone⁶. L'analyse dose-réponse nous révèle de plus la très grande sensibilité à l'oestradiol de l'épithélium intestinal du nouveau-né, avec un ED₅₀ de 9 ng/kg/j, soit 10 000 fois plus sensible que chez la ratte adulte (*cf* Braniste *et al*, 2009).

⁶ l'aromatase des ovaires permettant la synthèse d'oestradiol à partir de la testostérone n'est exprimée qu'en fin de première semaine postnatale, dès la maturation des premiers follicules, avec des niveaux d'oestradiol circulants au demeurant très faibles jusqu'à la puberté (Weniger *et al*, 1993).

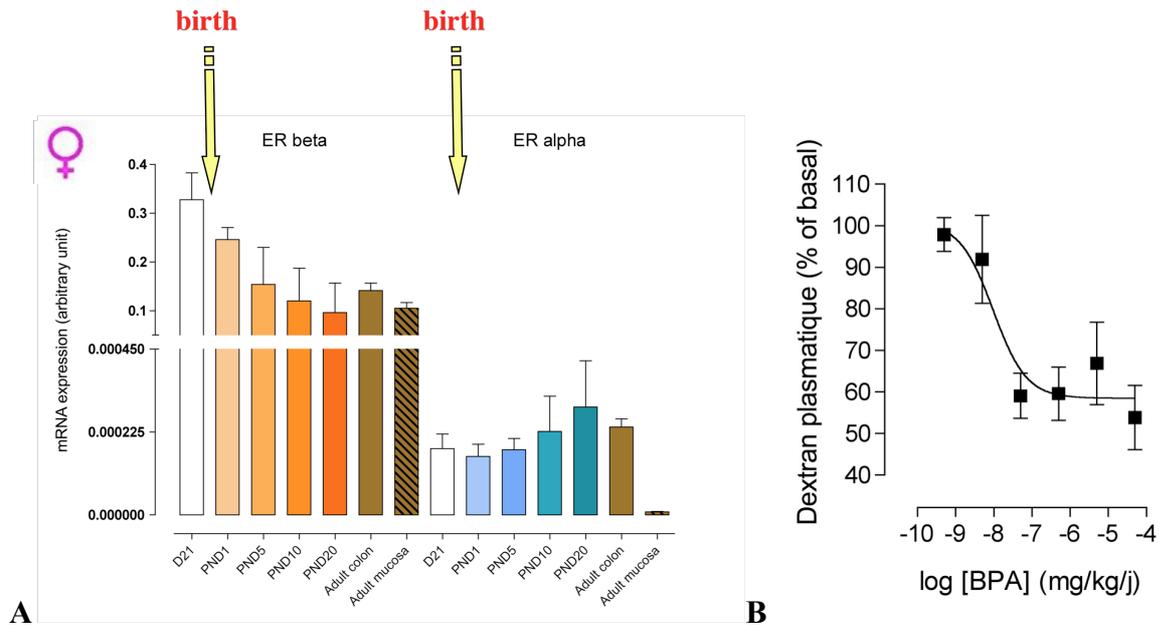
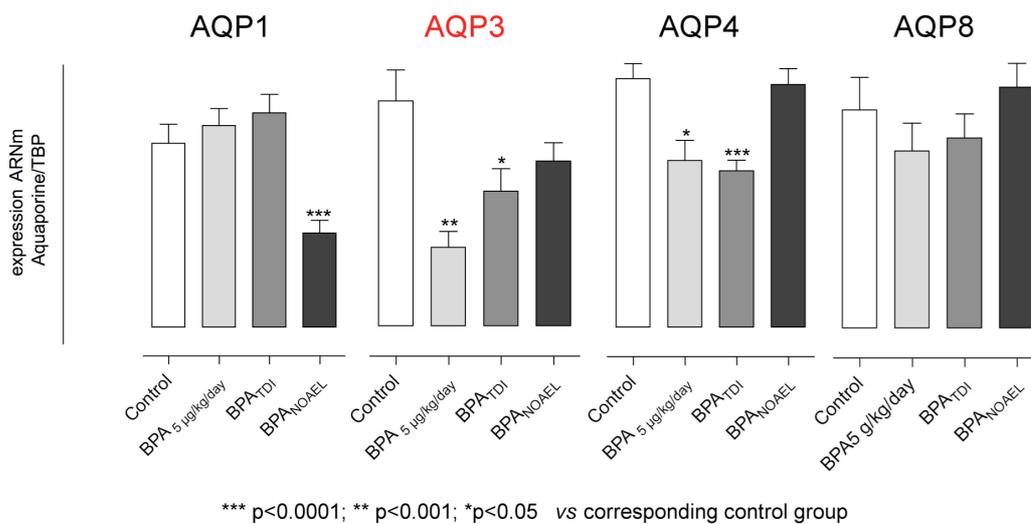


Figure 32 (A) Cinétique d’expression des ARNm codant pour ERbeta et ERalpha dans le côlon de ratte de la fin de la vie foetale (dernier jour de gestation, Day 21) jusqu’à l’âge adulte. (B) Effet dose-réponse de l’oestradiol (5 jours sc) sur la perméabilité intestinale totale au Dextran (administré *per os*) chez le nouveau-né femelle âgé de 10 jours ($ED_{50} = 9 \text{ ng/kg/j}$, soit 10 000 fois inférieur par rapport à l’adulte).

Très récemment, nous avons également étudié l’expression des aquaporines (AQP) dans le côlon, des protéines exprimées par les cellules épithéliales permettant le passage passif d’eau entre la lumière et la muqueuse. Comptant une dizaine de formes et exprimées dans tout épithélium/endothélium de l’organisme, les AQP 1, 3, 4 et 8 sont fortement exprimées dans l’intestin. Nous montrons que l’expression ARNm des AQP 3 et 4 est très significativement diminuée chez le nouveau-né femelle exposée au BPA *via* sa mère dès la DJT, avec un effet exacerbé à $5 \mu\text{g/kg/j}$ pour l’AQP3 (**Fig 33**).



*** $p < 0.0001$; ** $p < 0.001$; * $p < 0.05$ vs corresponding control group

Figure 33 Expression des ARNm codant pour les aquaporines 1, 3, 4 et 8 dans le côlon de rat (nouveau-né femelle âgé de 10 jours) exposé ou non en période périnatale au BPA aux doses de références et inférieures ($5 \mu\text{g/kg/j}$). DESNO [NOAEL], DJT [TDI].

Outre des altérations dans les échanges hydriques (en complément de la réduction du passage paracellulaire des fluides), l'AQP3 est aussi une voie de transport du glycérol (aquaglycéroporine) nécessaire à la prolifération cellulaire. Une étude récente chez la souris KO a montré l'importance de l'AQP3 dans le renouvellement de l'épithélium dans le côlon, un *turn over* rapide et constant de prolifération des entérocytes depuis les cellules germinales situées en fond de cryptes et d'apoptose une fois en surface (Thiagarajah *et al*, 2007). Conséquence, le renouvellement permanent de l'épithélium intestinal est considérablement ralenti, en particulier dans les processus de réparation tissulaire, un processus de dérégulation déjà observé chez les patients MICI (Dohi *et al*, 2005 ; Pull *et al*, 2005). Nous avons contrôlé ce point chez les rats de 10 jours et exposés au BPA à la plus faible dose dès la vie fœtale (5µg/kg/jour administrés aux mères): chez les nouveaux-nés femelles, des données préliminaires témoignent d'un renouvellement ralenti de l'épithélium dans l'intestin en développement, comme en témoigne une diminution de 10% du taux de cellules en cours de division dans les cryptes du côlon.

De plus, les souris KO pour l'AQP3 développent des inflammations intestinales sévères à l'âge adulte par rapport aux WT (Thiagarajah *et al*, 2007), une caractéristique commune au résultat de l'exposition périnatale au BPA chez la ratte (notre étude, Braniste *et al*, 2010). Outre les effets déjà discutés du BPA sur la perméabilité paracellulaire, un lien causal pourrait aussi exister entre la réduction BPA-dépendante d'expression de l'AQP3, les altérations du développement épithélial et la fragilité de la fonction de barrière intestinale. Nous vérifierons cette hypothèse dans le projet *PérinaTox*, en recherchant les niveaux résultant d'expression d'AQPs chez l'adulte exposé en période périnatale.

CONCLUSION

... allier le fondamental à la recherche appliquée en toxicologie alimentaire

Dans la mesure où des récepteurs aux oestrogènes (et probablement aussi ceux des hormones sœurs progestérone et testostérone) sont exprimés tout au long de l'intestin, la notion que la fonction digestive puisse être influencée par la fonction de reproduction (donc l'activité des gonades) appuie définitivement les contours de la thématique de recherche que je développe depuis 2003 (interactions viscéro-viscérales, endocrinologie des stéroïdes sexuels, alimentation et xéno-hormones).

Ce domaine reste très peu exploré dans la littérature, essentiellement argumenté en cancérogenèse colorectale où des changements dans la balance d'expression des ER α et β signalent la progression de la tumeur. Côté régulation de la fonction de barrière intestinale, si les propriétés anti-inflammatoires des oestrogènes ouvrent des perspectives intéressantes chez les patients souffrant de MICI (à finalités préventives et/ou dans le traitement symptomatique), les aspects fondamentaux de régulation oestrogénique de la barrière épithéliale et immunitaire le long de l'appareil digestif sont trop peu connues pour des applications cliniques à l'aveugle, en témoignent les avis opposés dans la littérature sur le potentiel protecteur ou au contraire aggravant d'une hormonothérapie substitutive chez les patientes souffrant de MICI (Garcia-Rodriguez *et al*, 2005 ; Kane et Reddy, 2008). Une recherche fondamentale reste ainsi très largement ouverte et essentielle, en particulier pendant la période de développement/maturation de la fonction de barrière intestinale où les oestrogènes ont vraisemblablement un rôle à jouer jusqu'à la puberté : du bon déroulement de la maturation pré- et postnatale de l'intestin dépendra l'efficacité de sa fonction *barrière* pour le reste de la vie (pour rappels les oestrogènes circulants contribuent à la régulation de la perméabilité intestinale et celle de la réactivité immunitaire des muqueuses).

A l'INRA, ouvrir ce champ de recherche obéit à une volonté de trouver des stratégies nutritives de bien-être et de prévention des maladies chroniques, ce qui nous oblige à nous pencher autant sur la question de l'effet des intrants alimentaires sur la barrière digestive (*e.g.* propriétés intrinsèques des phytoestrogènes, biodisponibilité, signalisation dans les muqueuses), qu'à sa transformation industrielle/distribution et les événements toxiques qui peuvent en découler (toxicologie orale des migrants de plastiques/plastifiants, évaluation du risque selon l'âge de l'individu)... soit à l'interface des Champs Thématiques 2 et 4 du Département « Alimentation Humaine ».

Les orientations que j'ai récemment prises, tant fondamentales qu'appliquées, sont donc fortement orientées « période périnatale ». Comme dit plus haut, elles posent la question de l'origine précoce des maladies chroniques de l'adulte (au moins dans l'intestin) dans le contexte de la perturbation endocrinienne au cours du développement. Aujourd'hui, elles se font l'écho de nombreuses questions sociétales sur l'innocuité pour l'homme de molécules hormono-mimétiques (BPA, phtalates et substitutifs à noyaux phénols) utilisées dans l'industrie alimentaire, où l'intestin est le premier organe exposé... le fœtus puis le nouveau-né les plus sensibles.

Etant *Physiologiste* de formation, non *Toxicologiste*, les projets de M2, Thèses et maintenant Post-Doc que je développe dans l'équipe NGN (ou en réseau dans l'UMR1331 Toxalim avec Pascal Martin) sont d'abord axés sur la nécessité d'identifier et de comprendre les régulations oestrogéniques dans les différents segments de l'intestin (la balance d'expression basale entre ER α et β variant du duodénum au côlon chez l'adulte), pour ensuite répondre à une question d'actualité sur les effets de facteurs environnementaux, potentiellement perturbateur hormonal, sur le développement des fonctions digestives (*e.g.*

axe intestin-foie, tolérance orale...). Depuis 2008, les progrès réalisés dans ces projets ont permis d'établir un réseau de collaborations entre plusieurs équipes de Toxalim, aujourd'hui support du projet *Périnatos* avec d'autres équipes INSERM et aboutissant à des questionnements plus larges (maladies métaboliques, cancérogenèse...), sans être dispersif pour notre propre équipe NGN, dont les recherches restent centrées sur la barrière intestinale. Nos recherches intègrent **i/** une description, à différents âges chez l'animal et sur cellules humaines en culture, des mécanismes cellulaires et moléculaires de modulation de la perméabilité intestinale par les oestrogènes et xénoestrogènes (V. Braniste, *Post-Doc*, N. Moussaoui, *Thèse*) et les conséquences *in vivo* pour le foie (N. Moussaoui), **ii/** une évaluation de l'intégration des messages nociceptifs d'origine viscérale, au niveau périphérique et spinal, deux étages nerveux sensibles aux stéroïdes sexuels (V. Braniste), **iii/** une description des événements perturbateurs dans le développement et l'acquisition de l'immunité des muqueuses de l'intestin chez le rat jeune, puis à l'âge adulte (S. Ménard, *CR2 de l'équipe*, en collaboration avec V. Braniste).

J'ai développé ces projets en complément des compétences de mes collègues d'équipe, où la « santé de l'intestin » est une thématique centrale, notamment dans le bénéfice des probiotiques affectant aussi bien la perméabilité intestinale, l'immunité des muqueuses et les systèmes nerveux entérique et central. La question des conséquences d'un « stress néonatal » sur la perméabilité de l'organe, largement explorée dans l'équipe dans la prédisposition aux maladies chroniques de l'intestin (SII), est également complémentaire de mes préoccupations. La comparaison d'effets du « stress psychologique » de séparation maternelle du nouveau-né (augmentation de perméabilité) avec le « stress chimique » des perturbateurs endocriniens au même âge (diminution) nous apporte tout l'argumentaire nécessaire à la compréhension des mécanismes précoces de maturation de l'intestin. Les oestrogènes sont pluripotents dans ces fonctions *extra-génitales*, tant dans le contrôle central de l'axe hypothalamo-hypophysaire régulant l'activité surrénalienne (axe HPA), que dans la modulation périphérique de la fonction de barrière, dès la naissance... Tout cet ensemble nous apporte une réelle expertise sur l'origine précoce des maladies digestives, la toxicologie alimentaire, l'élaboration de stratégies nutritives en réponse à ces nouveaux questionnements pour la santé humaine, où l'appareil endocrinien de la fonction de la reproduction a une partition à jouer quel que soit l'âge... *au fil des hormones*.

BIBLIOGRAPHIE

- Ait-Belgnaoui A, Bradesi S, Fioramonti J, Theodorou V, Bueno L (2005). Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase. *Pain* 113: 141-7.
- Al-Jefout M, Dezarnaulds G, Cooper M, Tokushige N, Luscombe GM, Markham R, Fraser IS (2009). Diagnosis of endometriosis by détection of nerve fibres in an endometrial biopsy : a double blind study. *Hum Reprod* 24: 3019-24.
- Alstead EM (2002). Inflammatory bowel disease in pregnancy. *Postgrad Med J* 78: 23-6.
- Altman G, Cain KC, Motzer S, Jarrett M, Burr R, Heitkemper M (2006). Increased symptoms in female IBS patients with dysmenorrhea and PMS. *Gastroenterol Nurs* 29: 4-11.
- Ashcroft GS, Mills SJ, Lei K, Gibbons L, Jeong MJ, Taniguchi M *et al* (2003). Estrogen modulates cutaneous wound healing by downrgulating macrophage migration inhibitory factor. *J Clin Invest* 111: 1309-18.
- Azooz OG, Farthing MJ, Savage MO, Ballinger AB (2001). Delayed puberty and response to testosterone in a rat model of colitis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R1483-91.
- Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R *et al* (2004). Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 126: 693–702.
- Bell C, Malcom SJ (1978). Observations on the loss of catecholamine fluorescence from intrauterine adrenergic nerves during pregnancy in the guinea-pig. *J Reprod Fert* 53: 51-8.
- Birk Y (1985). The Bowman-Birk Inhibitor, trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. *Int J Pept Protein Res* 25: 113-31.
- Bondesson M, Jönsson J, Pongratz I, Olea N, Cravedi JP, Zalko D *et al* (2009). A CASCADE of effects of bisphenol A. *Reprod Toxicol* 28: 563-7.
- Boyd JW, Lechuga TJ, Ebner CA, Kirby MA, Yellon SM (2009). Cervix remodeling and parturition in the rat: lack of a role for hypogastric innervation. *Reproduction* 137: 739-48.
- Bradesi S, Eutamene H, Garcia-Villar R *et al* (2003). Stress-induced visceral hypersensitivity in female rats is estrogen-dependent and involves tachykinin NK1 receptors. *Pain* 102: 227–34.
- Bradley RJ, Rosen MP (2004). Subfertility and gastrointestinal disease : ‘unexplained’ is often diagnosed. *Obstet Gynecol Surv* 59: 108-17.
- Brain CE, Savage MO (1994). Growth and puberty in chronic inflammatory bowel disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 8: 83-100.
- Brauer MM (2008). Cellular and molecular mechanisms underlying plasticity in uterine sympathetic nerves. *Auton Neurosci* 140: 1-16.
- Bukulmez O, Arici A (2000). Leukocytes in ovarian function. *Human Reprod Update* 6: 1-15.
- Calafat AM, Kuklennyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL (2005). Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* 113: 391-5.
- Calandra T, Roger T (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 791-800.
- Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B (2001). Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ER β isoforms in colon cancer. *Cancer Res* 61: 632–40.
- Catassi C, Bonucci A, Coppa GV, Carlucci A, Giorgi PL (1995). Intestinal permeability changes during the first month: effect of natural versus artificial feeding. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 21: 383-6.

- Chiba T, Masuko S (1989). Coexistence of multiple peptides in small intensely fluorescent (SIF) cells of inferior mesenteric ganglion of the guinea pig. *Cell Tissue Res* 255: 523-7.
- Crane, L.H. and L. Martin (1991). Pace maker activity in the myometrium of the oestrous rat: In vivo studies using video laparoscopy. *Reprod Fertil Dev* 3: 519-27.
- de Jong YP, Abadia-Molina AC, Satoskar AR, Clarke K, Rietdijk ST, Faubion WA, Mizoguchi E, Metz CN, Al Sahli M, ten Hove T, Keates AC, Lubetsky JB, Farrell RJ, Michetti P, van Deventer SJ, Lolis E, David JR, Bhan AK, Terhorst C (2001). Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat Immunol* 2: 1061-6.
- Dohi T, Ejima C, Kato R, Kawamura YI, Kawashima R, Mizutani N, Tabuchi Y, Kojima I (2005). Therapeutic potential of follistatin for colonic inflammation in mice. *Gastroenterology* 128: 411-23.
- Drossman DA, Ringel Y, Vogt BA, Leserman J, Lin W, Smith JK, Whitehead W (2003). Alterations of brain activity associated with resolution of emotional distress and pain in a case of severe irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 124: 754-61.
- Dunlop SP, Hebden J, Campbell E *et al* (2006). Abnormal intestinal permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable bowel syndromes. *Am J Gastroenterol* 101: 1288-94.
- Fåk F, Ahrné S, Molin G, Jeppsson B, Weström B (2008). Microbial manipulation of the rat dam changes bacterial colonization and alters properties of the gut in her offspring. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294: G148-54.
- Fanchin R, Ayoubi JM, Righini C, Olivennes F, Schönauer LM, Frydman R (2001). Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. *Hum Reprod* 16: 1115-9.
- Fanchin R, Ayoubi JM (2001). Uterine dynamics : impact on the human reproduction process. *Reprod Biomed Online* 18 Suppl 2: 57-62.
- Fanchin R, Picone O, Ayoubi JM, Marcadet-Fredet S, Kadoch J, Frydman R (2002). Uterine contractility and reproduction : new perspectives. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 31: 325-32.
- Feng M, Qin J, Wang C, Ye Y, Wang S, Xie D, Wang PS, Liu C (2009). Estradiol upregulates the expression of oxytocin receptor in colon in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E1059-66.
- Garcia Rodriguez LA, Gonzalez-Perez A, Johansson S, Wallander MA (2005). Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population. *Aliment Pharmacol Ther* 22: 309-15.
- Gecse K, Róka R, Ferrier L, Leveque M, Eutamene H, Cartier C, Ait-Belgnaoui A, Rosztóczy A, Izbéki F, Fioramonti J, Wittmann T, Bueno L (2008). Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. *Gut* 57: 591-9.
- Heitkemper MM, Cain KCC, Jarrett ME, Burr RL, Hertig V, Bond EF (2003). Symptoms across the menstrual cycle in women with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 98: 420-30.
- Heitkemper MM, Chang L (2009). Do fluctuations in ovarian hormones affect gastrointestinal symptoms in women with irritable bowel syndrome? *Gend Med* 6 Suppl 2:152-67.
- Heitkemper MM, Jarrett ME (2008). Update on irritable bowel syndrome and gender differences. *Nutr Clin Pract* 23: 275-83.
- Hogan AM, Collins D, Baird AW, Winter DC (2009). Estrogen and its role in gastrointestinal health and disease. *Int J Colorectal Dis* 24: 1367-75.
- Homma H, Hoy E, Xu DZ, Lu Q, Feinman R, Deitch EA (2005). The female intestine is more resistant than the male intestine to gut injury and inflammation when subjected to conditions associated with shock states. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288: G466-72.

- Houghton LA, Lea R, Jackson N, Whorwell PJ (2002). The menstrual cycle affects rectal sensitivity in patients with irritable bowel syndrome but not healthy volunteers. *Gut* 2002 50: 471-4.
- Huber K (2006). The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives. *Dev Biol* 298: 335-43.
- Hubert J, Berger M, Daydé J (2005). Use of a simplified HPLC-UV analysis for soyasaponin B determination : study of saponin and isoflavone variability in soybean cultivars and soy-based health food products. *J Agric Food Chem* 53: 3923-30.
- Kane S (2003). Inflammatory bowel disease in pregnancy. *Gastroenterol Clin North Am* 32: 323-40.
- Kane SV, Reddy DR (2008). Hormonal replacement therapy after menopause is protective of disease activity in women with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 103: 1193-6.
- Kanerva L, Lietzén R, Teräväinen H (1972). Catecholamines and cholinesterases in the paracervical (Frankenhäuser) ganglion of normal and pregnant rats, *Acta Physiol Scand* 86 271-7.
- Karsch FJ, Battaglia DF (2002). Mechanisms for endotoxin-induced disruption of ovarian cyclicity: observations in sheep. *Reprod Suppl* 59: 101-13.
- Keast JR (2006). Plasticity of pelvic autonomic ganglia and urogenital innervation. *Int Rev Cytol* 248: 141-208.
- Kennelly R, Kavanagh DO, Hogan AM, Winter DC (2008). Oestrogen and the colon: potential mechanisms for cancer prevention. *Lancet Oncol* 9: 385-91.
- Kim HS, Han SY, Yoo SD, Lee BM, Park KL (2001). Potential estrogenic effects of bisphenol-A estimated by in vitro and in vivo combination assays. *J Toxicol Sci* 26: 111-8.
- Kim JH, Sung IK, Park HS, Jin CJ, Choe WH, Kwon SY et al (2007). Irritable bowel syndrome is more common in women regardless of the menstrual phase: a Rome II-based survey. *J Korean Med Sci* 22: 851-4.
- King AE, Critchley HO (2010). Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory processes in the human endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol* 120: 116-26.
- Kirby MA, Groves MM, Yellon SM (2010). Retrograde tracing of spinal cord connections to the cervix with pregnancy in mice. *Reproduction* 139: 645-53.
- Konstantinopoulos PA, Kominea A, Vantoros G, Sykiotis GP, Andricopoulos P, Varakis I et al (2003). Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *Eur J Cancer* 39: 1251-8.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S et al (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors {alpha} and {beta}. *Endocrinology* 138: 863-70.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT et al (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139: 4252-63.
- Kulkarni PS, Wakade AR, Kirpekar SM (1976). Sympathetic innervation of guinea pig uterus and ovary. *Am J Physiol* 230: 1400-5.
- Kunz G, Beil D, Deininger H, Wildt L, Leyendecker G (1996). The dynamics of rapid sperm transport through the female genital tract: evidence from vaginal sonography of uterine peristalsis and hysterosalpingoscintigraphy. *Human Reprod* 11: 627-32.
- Langley JN, Anderson HK (1895). The Innervation of the Pelvic and adjoining Viscera: Part II. The Bladder. Part III. The External Generative Organs. Part IV. The Internal Generative Organs. Part V. Position of the Nerve Cells on the Course of the Efferent Nerve Fibres. *J Physiol* 19: 71-139.

- Langley JN, Anderson HK (1896). The Innervation of the Pelvic and adjoining Viscera: Part VI. Histological and Physiological Observations upon the Effects of Section of the Sacral Nerves. *J Physiol* 19: 372-84.
- Latini C, Frontini A, Morroni M, Marzioni D, Castellucci M, Smith PG (2008). Remodeling of uterine innervation. *Cell Tissue Res* 334: 1-6.
- Leboeuf B, Delgadillo JA, Manfredi E, Piacère A, Clément V, Martin P, Pellicer M, Boué P, de Cremoux R (2008). Management of goat reproduction and insemination for genetic improvement in France. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 2:379-85.
- Lee OY, Mayer EA, Schmulson M, Chang L, Naliboff B (2001). Gender-related differences in IBS symptoms. *Am J Gastroenterol* 96: 2184-93.
- Legrand C, Banuelos-Nevarez A, Maltier J-P (1989). Changes in electrical activity of myometrium during intrauterine distribution of rat blastocysts and after prazosin administration. *J Reprod Fert* 86: 39-49.
- Legrand C, Banuelos-Nevarez A, Rigolot C, Maltier J-P (1987). Comparative effects of 6-hydroxydopamine and α -adrenoreceptor antagonists on intrauterine migration and spacing of blastocysts in the rat. *J Reprod Fert* 81: 51-58.
- Lichtenstein GR, Deren JJ, Katz S, Lewis JD, Kennedy AR, Ware JH (2008). Bowman-Birk inhibitor concentrate: a novel therapeutic agent for patients with active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 53(1): 175-80.
- Maltier JP *et al* (1987). Turnover and metabolism of adrenaline and noradrenaline in the uterus of preparturient rats: Effects of steroid hormones and 6-hydroxydopamine. *Exp Clin Endocrinol* 6: 211-2.
- Matthews JB, Twomey K, Zacharews TR. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors α and β . *Chem Res Toxicol* 2001; 149-57.
- Mayer EA, Naliboff B, Lee O, Munakata J, Chang L (1999). Review article: gender-related differences in functional gastrointestinal disorders. *Aliment Pharmacol Ther* 13 Suppl 2: 65-9.
- Mitchell BF, Taggart MJ (2009). Are animal models relevant to key aspects of human parturition? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R525-45.
- Morris JL, Gibbins IL (1987). Neuronal colocalization of peptides, catecholamines, and catecholamine-synthesizing enzymes in guinea pig paracervical ganglia. *J Neurosci* 7: 3117-30.
- Murakami H, Akbar SMF, Matsui H, Onji M (2001). Macrophage migration inhibitory factor in the sera and at the colonic mucosa in patients with ulcerative colitis: clinical implications and pathogenic significance. *Eur J Clin Invest* 31: 337-43.
- O'Mahony F, Thomas W, Harvey BJ (2009). Novel female sex-dependent actions of oestrogen in the intestine. *J Physiol* 587: 5039-44.
- Ohkawara T, Miyashita K, Nishihira J, Mitsuyama K, Takeda H, Kato M, Kondo N, Yamasaki Y, Sata M, Yoshiki T, Sugiyama T, Asaka M (2005). Transgenic over-expression of macrophage migration inhibitory factor renders mice markedly more susceptible to experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 140: 241-8.
- Papka RE, Mowa CN (2003). Estrogen receptors in the spinal cord, sensory ganglia, and pelvic autonomic ganglia. *Int Rev Cytol* 231: 91-127.
- Papka RE, Traurig HH (1993). Autonomic efferent and visceral sensory innervation of the female reproductive system: Special reference to neurochemical markers in nerves and ganglionic connections. In C.A. Maggi (ed.): *Nervous control of the urogenital system*. Chur: Harwood Academic Publishers, pp. 423-66.

- Papka RE, Traurig HH, Klenn P (1987). Paracervical ganglia of the female rat: histochemistry and immunocytochemistry of neurons, SIF cells, and nerve terminals. *Am J Anat* 179: 243-57.
- Piche T, Barbara G, Aubert P, Bruley des Varannes S, Dainese R, Nano JL, Cremon C, Stanghellini V, De Giorgio R, Galmiche JP, Neunlist M (2009). Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome : involvement of soluble mediators. *Gut* 58: 196-201.
- Pierzynski P, Oczeretko E, Laudanski P, Laudanski T (2007). New research models and novel signal analysis in studies on preterm labor: a key to progress? *BMC Pregnancy Childbirth* 7 Suppl 1: S6.
- Pull SL, Doherty JM, Mills JC, Gordon JI, Stappenbeck TS (2005). Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 99-104.
- Reddy SI, Wolf JL (2001). Management issues in women with inflammatory bowel syndrome. *J Am Osteopath Assoc* 101: S17-23.
- Róka R, Demaude J, Cenac N, Ferrier L, Salvador-Cartier C, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Bueno L (2007). Colonic luminal proteases activate colonocyte protéinase-activated receptor-2 and regulate paracellular permeability in mice. *Neurogastroenterol Motil* 19: 57-65.
- Rosengren E, Sjöberg NO (1967). The adrenergic nerve supply to the female reproductive tract of the cat. *Am J Anat* 121(2): 271-83.
- Routledge EJ, White R, Parker MG, Sumpter JP (2000). Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) α and ER β . *J Biol Chem* 275: 35986-93.
- Rubin BS, Soto AM (2009). Bisphenol A : perinatal exposure and body weight. *Mol Cell Endocrinol* 304: 55-62.
- Sanoja R, Cervero F (2008). Estrogen modulation of ovariectomy-induced hyperalgesia in adult mice. *Eur J Pain* 12: 573-81.
- Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, Heubi JE (2002). Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr* 76: 447-53.
- Somm E, Schwitzgebel VM, Toulotte A, Cederroth CR, Combescure C, Nef S *et al* (2009). Perinatal exposure to bisphenol A alters early adipogenesis in the rat. *Environ Health Perspect* 117: 1549-55.
- Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP *et al* (2000). Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute Campylobacter enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 47: 804-11.
- Stjernquist M, Owman C (1985). Cholinergic and adrenergic neural control of smooth muscle function in the non pregnant rat uterine cervix. *Acta Physiol Scand* 124: 429-436.
- Thiagarajah JR, Zhao D, Verkman AS (2007). Impaired enterocyte proliferation in aquaporin-3 deficiency in mouse models of colitis. *Gut* 2007 56: 1529-35.
- Thorbert G, Alm P, Owman C, Sjöberg NO (1977). Regional distribution of autonomic nerves in guinea-pig uterus. *Am J Physiol* 233: C25-C34.
- Törnblom H, Lindberg G, Nyberg B, Veress B (2002). Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 123: 1972-9.
- van Lipzig MM, ter Laak AM, Jongejan A, Vermeulen NP, Wamelink M, Geerke D, Meerman JH (2004). Prediction of ligand affinity and orientation of xenoestrogens to the

- estrogen receptor by molecular dynamics simulations and the linear interaction energy method. *J Med Chem* 47: 1018-30.
- Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 24: 139-77.
- Verdu EF, Deng Y, Bercik P, Collins SM (2002). Modulatory effects of estrogen in two murine models of experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G27-36.
- Wada-Hiraike O, Imamov O, Hiraike H, Hultenby K, Schwend T, Omoto Y *et al* (2006). Role of estrogen receptor β in colonic epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2959-64.
- Whitehead WE, Cheskin LJ, Heller BR, Robinson JC, Crowell MD, Benjamin C, Schuster MM (1990). Evidence for exacerbation of irritable bowel syndrome during menses. *Gastroenterology* 98: 1485-9.
- Wong SC, Macrae VE, McGrogan P, Ahmed SF (2006). The role of pro-inflammatory cytokines in inflammatory bowel disease growth retardation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 43: 144-55.
- Xiao E, Xia-Zhang L, Ferin M (1998). Stress and the menstrual cycle: relevance of cycle quality in the short- and long-term response to a 5-day endotoxin challenge during the follicular phase in the rhesus monkey. *J Clin Endocr Metab* 83: 2454-60.
- Xiao E, Xia-Zhang L, Ferin M (1999). Stress and the menstrual cycle: short- and long-term response to a 5-day endotoxin challenge during the luteal phase in the rhesus monkey. *J Clin Endocr Metab* 84: 623-6.
- Zalko D, Soto AM, Dolo L, Dorio C, Rathahao E, Debrauwer L *et al* (2003). Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect* 111: 309-19.